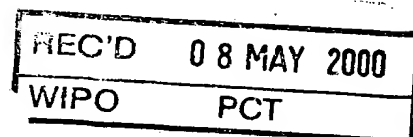




PCT/FR 00 / 00 69 1

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**COPIE OFFICIELLE****09/936835**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **12 AVR. 2000**

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

This Page Blank (uspto)



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI



N° 55-1328

RÉCÉPISSÉ DE DÉPÔT

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir en lettres capitales

DB 540e W/170299

DATE DE REMISE DES PIÈCES

28 OCT. 1999

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

LY 28 OCT. 1999
9913755

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À
QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET GERMAIN & MAUREAU
BP 6153
69466 LYON CEDEX 06

n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone
MD/MK/B05B3352/A 04 72 69 84 30

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen



demande initiale

☐ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

PROCÉDE DE DETECTION D'UNE ACTIVITE SUPERANTIGENIQUE DANS UN ECHANTILLON ET COMPOSITION
THERAPEUTIQUE OU PROPHYLACTIQUE

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN 6.7.3.6.2.0.3.9.9

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

BIO MERIEUX

Forme juridique

SA

Nationalité (s) FRANCAISE

Adresse (s) complète (s)

Chemin de l'Orme

69280 MARCY L'ETOILE

Pays

FRANCE

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

FRANCE

99 03622

19 mars 1999

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

Didier DIDIER
CPI 971202


SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 1.
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 W / 260899

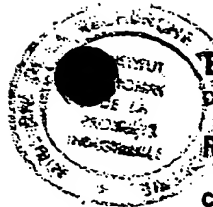
Vos références pour ce dossier (facultatif)		MD/MK/B 05 B 3352 FR/A	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		99 13755	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PROCÉDE DE DETECTION D'UNE ACTIVITE SUPERANTIGENIQUE DANS UN ECHANTILLON ET COMPOSITION THERAPEUTIQUE OU PROPHYLACTIQUE			
LE(S) DEMANDEUR(S) : CABINET GERMAIN & MAUREAU BP 6153 69466 LYON CEDEX 06 FRANCE			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		PERRON	
Prénoms		Hervé	
Adresse	Rue	15 rue de Boyer	
	Code postal et ville	69005	LYON
Société d'appartenance (facultatif)		BIO MERIEUX	
Nom		LAFONT	
Prénoms		Monique	
Adresse	Rue	2 Hameau d'Alleray	
	Code postal et ville	75015	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)		CNRS	
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Le 20 mars 2000 Mireille DIDIER CPI 971202			

INPIINSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

**BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

RÉCÉPISSÉ DE DÉPÔT**cerfa**

N° 55 -1328

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir en lettres capitales

DB 540e W/170299

DATE DE REMISE DES PIÈCES 28 OCT. 1999		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		CABINET GERMAIN & MAUREAU	
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT		BP 6153	
DATE DE DÉPÔT 28 OCT. 1999		69466 LYON CEDEX 06	
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle		n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone	
<input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire		MD/MK/B05B3352/A 04 72 69 84 30	
<input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n°	
Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat		date	
Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non			
Titre de l'invention (200 caractères maximum)			
PROCÉDE DE DETECTION D'UNE ACTIVITE SUPERANTIGENIQUE DANS UN ECHANTILLON ET COMPOSITION THERAPEUTIQUE OU PROPHYLACTIQUE			
3 DEMANDEUR (S) n° SIREN 6.7.3.6.2.0.3.9.9		code APE-NAF	
Norm et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination		Forme juridique	
BIO MERIEUX		SA	
Nationalité (s) FRANCAISE			
Adresse (s) complète (s)		Pays	
Chemin de l'Orme		FRANCE	
69280 MARCY L'ETOILE			
En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre <input type="checkbox"/>			
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée			
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission			
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE			
pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande
FRANCE	99 03622	19 mars 1999	
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date			
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire)		SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION	
Didier DIDIER CPI 971202			

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.. / 1..

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260599

Vos références pour ce dossier (facultatif)		MD/MK/B 05 B 3352 FR/A	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		99 13755	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
PROCÉDE DE DETECTION D'UNE ACTIVITE SUPERANTIGENIQUE DANS UN ECHANTILLON ET COMPOSITION THERAPEUTIQUE OU PROPHYLACTIQUE			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
CABINET GERMAIN & MAUREAU BP 6153 69466 LYON CEDEX 06 FRANCE			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		PERRON	
Prénoms		Hervé	
Adresse	Rue	15 rue de Boyer	
	Code postal et ville	69005	LYON
Société d'appartenance (facultatif)		BIO MERIEUX	
Nom		LAFONT	
Prénoms		Monique	
Adresse	Rue	2 Hameau d'Alleray	
	Code postal et ville	75015	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)		CNRS	
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Le 20 mars 2000 Mireille DIDIER CPI 971202			

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie chronique du système nerveux central de l'homme, évoluant par succession de phases de rémission et de poussée ou selon une progression régulière, dont la caractéristique anatomopathologique consiste en la formation de zones de démyélinisation bien délimitées dans la substance blanche du cerveau et de la moelle épinière.

Au niveau histologique, ces zones présentent au stade précoce du processus lésionnel, une dégradation de la myéline péri-axonale associée à une atteinte des cellules gliales responsable de cette démyélinisation. Une activation macrophagique inflammatoire impliquant les cellules microgliales (macrophages tissulaires résidants du système nerveux central), ainsi que, probablement, des macrophages provenant de monocytes sanguins infiltrés, est associée à ce processus de démyélinisation et contribue à la destruction des feuillet myélinisés. Au centre de la zone démyélinisée, une déplétion relative en cellules gliales est retrouvée alors qu'une prolifération d'astrocytes se développe à la périphérie et peut envahir la plaque démyélinisée pour générer une plaque fibreuse ou gliotique. Ces structures sclérotiques sont à l'origine du nom donné à la maladie.

Une autre caractéristique de ces plaques est leur association quasi systématique avec un élément vasculaire autour duquel elles se développent.

Au niveau histologique, on observe une altération fréquente de la barrière hémato-encéphalique (BHE) constituée par l'endothélium capillaire. Un des éléments déterminants dans le maintien de la BHE est constitué par la présence sous-jacente d'extensions cytoplasmiques des astrocytes, appelées pieds astrocytaires. Vraisemblablement, les pieds astrocytaires induisent la formation ou permettent le maintien de structures de jonction étanches qui assurent la cohésion de la barrière endothéliale capillaire concrétisant la BHE. Or, différents modèles pathologiques font état de l'altération de la BHE et d'une déplétion des pieds astrocytaires.

Par ailleurs, dans le processus lésionnel de la SEP, l'altération de la BHE contribue à amplifier la réponse inflammatoire associée, par l'afflux de cellules lymphoïdes provenant de la circulation sanguine. La contribution de l'inflammation associée aux cellules immunitaires est importante dans la SEP et participe au processus lésionnel.

L'étiologie de la SEP est la source d'un débat d'actualité parce que la maladie pourrait avoir des causes multiples. Des arguments ont été avancés en faveur d'une hypothèse bactérienne, virale ou auto-immune.

Les rétrovirus sont des candidats potentiellement intéressants pour l'étude étiologique de la sclérose en plaques, par analogie avec une maladie ovine très proche de la SEP, induite chez le mouton par un rétrovirus exogène : le virus MAEDI-VISNA. L'infection expérimentale de moutons par inoculation intra-ventriculaire de souches neurovirulentes du virus VISNA a permis d'établir la responsabilité de ce virus dans la genèse de l'infection démyélinisante du mouton.

De nombreux travaux ont été réalisés pour étayer l'hypothèse d'une étiologie virale de la maladie et la découverte que HTLV-1, un oncovirus, est associé à une myélopathie chronique et progressive, la Paraparésie Spastique Tropicale (PST), a relancé l'intérêt pour les virus, sans qu'il ait pu être établi un lien de causalité entre virus et sclérose en plaques.

Récemment, les travaux de H. Perron et al. (Res. Virol. 1989 ; 140, 551-561 ; " Current Concepts in Multiple Sclerosis " Wiethöler et al., eds. Amsterdam, Elsevier, 1991, 111-116 et the Lancet 1991 ; 337, 862-863) ont permis à partir d'une ponction lombaire de liquide céphalo-rachidien d'un patient SEP d'isoler une lignée non immortalisée de cellules non lymphoïdes et de mettre en évidence la présence d'un virus, présentant les caractéristiques d'un rétrovirus et montrant en particulier un pic correspondant à une activité transcriptase inverse, dans le surnageant de culture de cette lignée. Plus récemment encore, ces mêmes auteurs ont

obtenu à partir de ce pic d'activité transcriptase inverse un ADN complémentaire qui correspondait au gène *pol* codant pour l'enzyme RT (transcriptase inverse ou reverse transcriptase). Ce rétrovirus, appelé MSRV par les auteurs, a notamment été caractérisé au niveau génomique dans la demande de brevet PCT WO 99/02666. L'analyse phylogénique, par comparaison de la séquence de la région *pol* de MSRV avec d'autres séquences *pol* disponibles dans les bases de données a permis de montrer que MSRV est proche de la famille ERV-9 (endogenous retrovirus-9).

Par ailleurs, F. Beseme et al. dans la demande de brevet PCT WO 99/02696 ont criblé une banque d'ADNc à l'aide d'une sonde Ppol-MSRV et détecté des clones chevauchants qui leur ont permis de reconstruire un ARN génomique putatif de 7582 nucléotides. Cet ARN génomique présente une structure R-U5-*gag-pol-env*-U3-R caractéristique des rétrovirus et une interrogation de plusieurs bases de données a permis de montrer qu'il existe une quantité importante de séquences génomiques (ADN) apparentées dans le génome humain qui sont retrouvées sur plusieurs chromosomes. Les auteurs ont ainsi mis en évidence l'existence de structures partielles de type rétroviral dans le génome humain et envisagé leur rôle potentiel dans des maladies auto-immunes, comme la sclérose en plaques. Cette nouvelle famille de rétrovirus endogènes a été dénommée HERV-W, en raison de ses caractéristiques structurales. L'analyse phylogénique dans la région *pol* a montré que la famille HERV-W est phylogéniquement proche des familles ERV-9 et RTVL-H et appartient donc à la famille des rétrovirus endogènes de type I. Par ailleurs, l'analyse phylogénique de la trame de lecture ouverte de *env* montre qu'elle est plus proche des rétrovirus simiens de type D et des rétrovirus de la réticuloendothéliose aviaire que des rétrovirus mammifères de type C, suggérant une structure de génome chimérique C/D. Les analyses des arbres phylogéniques montrent que les familles ERV-9 et HERV-W dérivent de deux vagues d'insertion indépendantes.

Tous ces éléments plaident en faveur de l'implication d'éléments rétroviraux dans la sclérose en plaques.

Il semble, par ailleurs, maintenant probable que des manifestations auto-immunes peuvent être induites par l'expression de superantigènes (SAGs).

Les superantigènes sont des molécules susceptibles de se lier à des molécules de classe II du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) et à des séquences peptidiques caractéristiques de certaines familles de récepteurs des cellules T ($V\beta$). Ces superantigènes activent un grand nombre de clones T, indépendamment du peptide antigénique reconnu par leur TCR (récepteur des cellules T) en association avec le CMH de la cellule présentatrice d'antigènes. La conséquence de cette activation est une prolifération polyclonale ou une induction d'anergie, voire d'apoptose, dans la population lymphocytaire T porteuse de ce $V\beta$. Les superantigènes sont des produits d'expression de micro-organismes, tels que bactéries et rétrovirus exogènes ou endogènes.

Le récepteur T (TCR) présent à la surface des lymphocytes et impliqué dans la reconnaissance d'un antigène ou d'un superantigène est constitué de deux chaînes, une chaîne α de 40 à 50 kDa et une chaîne β de 35 à 47 kDa, liées entre elles par un pont disulfure. Chaque chaîne polypeptidique comprend deux domaines d'environ 110 acides aminés chacun, qui sont organisés comme les domaines des immunoglobulines. Ils sont ancrés dans la membrane plasmique par un peptide transmembranaire et possèdent une courte queue cytoplasmique. La différence de poids moléculaire entre les deux chaînes α et β est due à la présence d'une chaîne carbohydratée en position N-terminale de la chaîne α . La variabilité de séquence en acides aminés réside dans le domaine N-terminal de chaque polypeptide α et β , homologues des domaines variables des immunoglobulines. Chaque domaine est codé par un réarrangement de gènes V, D et J pour la chaîne β et V et J pour la chaîne α . L'analyse des

séquences de ces différents domaines TCR V révèle une grande variabilité qui correspond aux régions hypervariables des immunoglobulines (CDRs). (Roitt I. et al., Immunology 3rd edition, Mosby, England).

Le réarrangement des gènes du TCR est similaire à celui des gènes des immunoglobulines. La diversité des TCRs provient d'une recombinaison génétique entre les segments V, D et J. Les gènes V β s, incluant les gènes D, J et C, sont groupés ensemble à l'exception de V β 14 qui est présent à l'extrémité 3' du locus. Une diversité extensive est générée pendant les procédés de regroupement des régions V-D-J, mais aussi V-J et V-D-D-J.

Un superantigène est capable d'activer les lymphocytes T de façon non spécifique, contrairement à un antigène. Un superantigène est capable de se fixer conjointement aux molécules du CMHII présentes à la surface des cellules présentatrices de l'antigène et aux molécules V β s du récepteur T présent à la surface des cellules T. La chaîne V β du TCR fixe le superantigène à l'extérieur du site spécifique d'antigène du TCR, mais cela est suffisant pour activer la cellule T. Cette fixation entraîne une induction de signaux intracellulaires dans la cellule T. Ces cascades de signaux intracellulaires induisent soit la prolifération de la cellule T portant le V β d'intérêt, soit une anergie ou une apoptose de la cellule. Ainsi, en fonction des conditions expérimentales, l'effet sur la sous population des lymphocytes T activée peut être un effet de prolifération, d'anergie ou d'apoptose polyclonale. Contrairement à une réponse T à un antigène classique, la stimulation des lymphocytes T est donc polyclonale et non oligoclonale, voire monoclonale (Scherer et al., 1993 Annu. Rev. Cell Biology 9 : 101-128). Cette induction de prolifération cellulaire, d'anergie ou d'apoptose dépend de plusieurs paramètres qui agissent en combinaison. Elle dépend en particulier de la concentration du superantigène et de l'existence de rencontres préalables de stimulations analogues ciblant le même V β par le système immunitaire du donneur de

lymphocytes T. La mise en anergie ou en apoptose peut suivre entre autre une stimulation ou activation prolongée des cellules T. Ainsi un superantigène a un effet induisant une variation positive ou négative d'une sous-population de cellules T d'un V β « x » défini. Un superantigène ciblant un déterminant antigénique V β « x » donné va interagir avec toute la sous-population lymphocytaire portant ce V β . L'effet induit par cette interaction couplée avec celle ciblant le CMHII des cellules présentatrices de l'antigène (APCs) est une variation significative du pourcentage des lymphocytes V β « x » par rapport aux autres lymphocytes T V β non « x ». Cette variation est typiquement soit une prolifération, soit une déplétion (Bernal A et al., 1999 J Clin Immunol 19 : 149 ; Li H et al., 1999 Annu Rev Immunol 17 : 435 ; Girgis et al., 1999 J Exp Med 189 : 265 ; Lavoie et al., Immunol Rev 1999 168 : 257 ; Cornwell WD et Rigers TJ, Immunology 1999 96 : 193 ; Wang ZQ et al., Immunology 1998 94 : 331 ; Maier CC et al., PNAS 1998 95 : 4499 ; Michie CA et Cohen J, Trends Microbiol 1998 6 : 61 ; La Bon A et al., Int Immunol 1999 11 : 373 ; Shen X et König R, Int Immunol 1998 10 : 247 ; Noble A et al., J Immunol 1998 160 : 559 ; Yang Y et al., Int Immunol 1998 10 : 175 ; Renno T et al., J Immunol 1999 162 : 6312 ; Roitt I et al., Immunology third edition, Mosby).

Par ailleurs, lorsque l'agent codant pour un superantigène donné est mis en présence de lymphocytes T, et non seulement en présence de la molécule purifiée portant l'activité superantigénique, l'effet immunologique résultant correspond à la superposition d'un effet superantigénique et de stimulations antigéniques variées causées par les autres antigènes de l'agent entier. Il est à noter que, contrairement à la stimulation superantigénique, ces dernières peuvent différer en fonction du HLA de classe II du donneur de lymphocytes ou du patient dans un contexte pathologique. Ceci a pour conséquence que la prolifération ou la déplétion T V β « x » s'accompagne d'un profil de réactivité (prolifération ou inhibition) d'autres sous populations V β s non « x », éventuellement variables selon le

HLA II ; ce profil étant défini par la nature des antigènes associés à l'agent ou à plusieurs agents (dans le cas d'une cascade conduisant à l'activation d'un rétrovirus endogène codant pour le superantigène exprimé dans ces conditions). Dans ce dernier cas, deux superantigènes peuvent être exprimés, si l'agent inducteur en produit un et si l'infection d'une cellule cible par celui ci réactive un rétrovirus endogène qui en produit alors un second. Ces données confirment donc la nécessité d'évaluer un profil complet de réponse T en fonction du V β lorsque l'on étudie un contexte « naturel » d'infection/réactivation et non une molécule superantigénique purifiée hors contexte.

La Demanderesse a maintenant montré que l'expression d'un superantigène ou d'une protéine ayant certains effets de type superantigène est associée à un état pathologique, par exemple un état associé à la sclérose en plaques.

L'activité superantigénique est induite directement ou indirectement par un agent effecteur, tel qu'une protéine ou un micro-organisme ou un agent pathogène, en particulier un rétrovirus (MSRV-1) et/ou un agent pathogène (MSRV-2).

De plus, la Demanderesse a également mis en évidence une production stimulée de cytokines, telles que l'IL-6, dans des cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains et mises en contact avec un extrait de surnageant ou une fraction d'un extrait de surnageant de culture cellulaire SEP.

La demanderesse a aussi mis en évidence un profil de réponse T, en fonction des V β s à un ou des agent(s) associé(s) à l'expression d'une molécule de type superantigénique.

Enfin, la Demanderesse a observé que les mêmes extraits provenant de patients SEP et/ou infectés par le rétrovirus MSRV-1 induisait une mort par apoptose significativement élevée dans les mêmes cellules mononucléées sanguines.

La Demanderesse a donc développé un procédé pour mettre en évidence les effets précités dans un échantillon biologique.

Les critères requis pour établir qu'une protéine ou qu'un micro-organisme est ou contient un superantigène ou une protéine ayant certains effets de type superantigène sont :

(i) la capacité de la protéine ou du micro-organisme à induire l'expansion ou la perte de certaines familles de lymphocytes porteuses au niveau de leur TCR d'une chaîne V β particulière, et

(ii) une activation des V β s indépendante de l'haplotype du CMH de classe II.

Il convient de noter que lorsque l'on parle d'activité superantigénique dans la présente invention, ceci signifie indifféremment l'expression d'un superantigène ou d'une protéine ayant certains effets de type superantigène (SAg-like).

L'invention concerne un procédé de détection d'une activité superantigénique dans un échantillon biologique, selon lequel on met en évidence une expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et/ou V β 17, préférentiellement V β 16.

Selon une variante avantageuse, on met en évidence un profil d'une expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et d'une co-expansion de lymphocytes porteurs de V β s choisis parmi au moins l'un quelconque des V β s 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, et préférentiellement des V β s 3 et 12.

L'invention concerne aussi un procédé de détection d'une activité superantigénique selon lequel on met en évidence une perte majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et/ou V β 17.

Selon une variante avantageuse, on met en évidence une perte majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et une co-diminution de lymphocytes porteurs de V β s choisis parmi au moins l'un

quelconque des V β s 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, de préférence des V β s 7, 14, et 17, et avantageusement des V β s 7 et 17.

La détection de l'expansion et éventuellement de la co-expansion ou de la perte et éventuellement co-diminution est effectuée par mise en évidence des molécules V β s membranaires associées aux cellules mononucléées sanguines, qui de préférence sont les lymphocytes T. On calcule ensuite un pourcentage de variation des molécules V β s détectées et provenant de tout ou partie du surnageant de culture de patients atteints de SEP par rapport au nombre de molécules V β s détectées dans tout ou partie d'un surnageant de culture provenant d'un donneur sain. Il est également possible de prévoir un mélange de surnageants de culture provenant de donneurs sains.

L'ensemble des molécules V β s est appelé répertoire V β des lymphocytes T. Les différentes molécules V β s sont détectées de manière spécifique par utilisation d'au moins une des techniques décrites ci-dessus :

(a) soit par utilisation d'au moins un ligand, c'est à dire toute molécule capable de reconnaître spécifiquement le V β à détecter, par exemple un anticorps monoclonal ou polyclonal anti-V β ou un fragment d'anticorps monoclonal ou polyclonal ou une molécule inhibitrice de la fonction du V β considéré. Le pourcentage des molécules V β s du répertoire est alors rapporté au pourcentage des cellules présentant la molécule CD3 à leur surface, cette dernière étant aussi détectée de manière spécifique par l'utilisation d'au moins un ligand. Par ligand, on entend notamment un anticorps monoclonal ou polyclonal ou un fragment desdits anticorps, de préférence un anticorps monoclonal. Les anticorps monoclonaux dirigés contre un V β d'intérêt sont produits par des techniques conventionnelles utilisées pour produire des anticorps contre des antigènes de surface. Des souris ou des lapins sont immunisés (i) soit avec une protéine naturelle ou recombinante, (ii) soit avec un peptide immunogène, (iii) soit avec des cellules murines qui expriment la protéine ou le peptide d'intérêt et les

molécules du CMHII. La lignée murine Balb/c est la plus fréquemment utilisée. L'immunogène peut être également un peptide choisi parmi les peptides définis à partir des séquences primaires des V β s d'intérêt. Les protéines ou peptides sont couplés à l'hémocyanine de Lymphet Keyhole (peptide-KLH), comme support pour son utilisation en immunisation, ou couplé à de l'albumine sérique humaine (peptide-HSA). Les animaux sont soumis à une injection de peptide -KLH ou de peptide -HSA en utilisant de l'adjuvant complet de Freund (IFA). Les sérums et les surnageants de culture d'hybridome issus des animaux immunisés avec chaque peptide sont analysés pour la présence d'anticorps par un test ELISA utilisant les molécules initiales. Les cellules spléniques de ces souris sont récupérées et fusionnées avec des cellules de myélome. Le polyéthylèneglycol (PEG) est l'agent de fusion le plus fréquemment utilisé. Les hybridomes produisant les anticorps les plus spécifiques et les plus sensibles sont sélectionnés. Les anticorps monoclonaux peuvent être produits *in vitro* par culture cellulaire des hybridomes produits ou par récupération de liquide d'ascite murin après injection intrapéritonéale des hybridomes chez la souris. Quel que soit le mode de production en surnageant ou en ascite, il importe ensuite de purifier l'anticorps monoclonal. Les méthodes de purification utilisées sont essentiellement la filtration sur gel échangeur d'ions ou par chromatographie d'exclusion, voire l'immunoprécipitation. Pour chaque anticorps il faut choisir la méthode qui permettra d'obtenir le meilleur rendement. Un nombre suffisant d'anticorps est criblé dans des tests fonctionnels pour identifier les anticorps les plus performants pour fixer la molécule d'intérêt et/ou pour bloquer l'activité de la molécule d'intérêt. Les anticorps monoclonaux sélectionnés sont humanisés par des méthodes standard de " CDR grafting " (protocole réalisé par de nombreuses compagnies, sous forme de service). Ces anticorps humanisés peuvent être testés cliniquement chez le patient. L'efficacité de ces anticorps peut être suivie par des paramètres cliniques. La production *in vitro* d'anticorps, de

fragments d'anticorps ou de dérivés d'anticorps, tels que les anticorps chimères humanisés ou non, produits par génie génétique, dans des cellules eucaryotes a été décrite (EP 120 694 ou EP 125 023) et est aussi applicable à la présente invention ;

5 (b) soit par biologie moléculaire après extraction des acides nucléiques des cellules mononucléées sanguines, entres autres les lymphocytes T, mises en présence de surnageant ou d'une fraction de surnageant de culture SEP et en présence d'une culture de surnageant ou d'une fraction de surnageant de culture témoin, amplification de leurs ARN
10 V β transcrits par RT-PCR, étude du profil des produits d'amplification sur gel et/ou séquençage et/ou électrophorèse. Pour l'étape de RT-PCR et/ou pour détecter de façon spécifique les produits d'amplification, on utilise des fragments d'ADN et/ou d'ARN codant pour le déterminant V β étudié ou pour un fragment de ce déterminant, et/ou des fragments d'ADN et/ou
15 d'ARN capables de s'hybrider et d'amplifier des fragments d'acides nucléiques codant pour le déterminant V β étudié par complémentarité des bases nucléiques. Le profil des fragments amplifiés dont la taille varie en fonction du réarrangement des chaînes spécifiques de chaque clone est déterminé par analyse électrophorétique et permet d'objectiver une
20 polyclonalité. La détection des fragments amplifiés d'ADN et/ou d'ARN codant pour le déterminant V β étudié peut aussi être réalisée par hybridation nucléotidique selon les techniques bien connues de l'homme de l'art (Southern Blot, Northern Blot, ELOSA « Enzyme-Linked Oligosorbent Assay » (Katz JB et al., Am. J. Vet. Res. 1993 Dec ; 54 (12) : 2021-6 et
25 François Mallet et al., Journal of Clinical Microbiology, June 1993, p1444-1449)).

Aussi, la présente invention a pour objet un procédé avantageux pour mettre en évidence de l'activité superantigénique précitée qui comprend les étapes suivantes :

(i) on prélève un surnageant de culture de cellules mononucléées sanguines ou de cellules de plexus choroïdes ou de cellules leptoméningées, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune, ou d'une lignée cellulaire établie, telles que les
5 cellules des lignées cellulaires PLI-2 déposée à l'ECACC le 22 juillet 1992, sous le numéro 92072201 et LM7PC déposée à l'ECACC le 8 janvier 1993, sous le numéro 93010817, conformément aux dispositions du Traité de Budapest, et

(ii) on met en contact ledit surnageant de culture ou une partie
10 du surnageant de culture avec une série de cultures, de préférence au moins trois, de cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains, et

(iii) on détecte ladite expansion et éventuellement une co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution des cellules
15 mononucléées sanguines de l'étape (ii).

En particulier les patients atteints de maladie auto-immune ou suspectés d'avoir un risque de développer le maladie sont des patients SEP et les cellules mononucléées sanguines productrices de molécules superantigéniques et provenant de patients atteints de SEP sont
20 notamment choisies parmi les lymphocytes B et les monocytes.

Les cellules mononucléées sanguines répondant à la stimulation et provenant de donneurs sains sont notamment choisies parmi les lymphocytes T.

Un autre procédé avantageux de l'invention consiste à

25 (i) prélever des cellules mononucléées sanguines, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou de patients suspectés d'avoir un risque de développer une maladie auto-immune et d'individus sains,

(ii) mettre en contact lesdites cellules mononucléées sanguines
30 provenant des patients ou d'individus sains avec des surnageants de

culture ou une fraction de surnageant de culture de cellules choisies parmi les cellules mononucléées sanguines, les cellules de plexus choroïdes et les cellules leptoméningées, les cellules issues de lignées cellulaires établies, telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 déposée à l'ECACC le 22
5 juillet 1992, sous le numéro 92072201 et LM7PC déposée à l'ECACC le 8 janvier 1993, sous le numéro 93010817, conformément aux dispositions du Traité de Budapest, et

(iii) détecter ladite expansion et éventuellement co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution à partir des cellules
10 mononucléées sanguines de l'étape (i).

En particulier, les cellules proviennent de patients atteints de sclérose en plaques ou suspectés d'avoir un risque de développer la maladie ou dérivent de culture de cellules issues de patients SEP.

La mise en évidence de ladite expansion et éventuellement co-expansion ou de ladite perte et éventuellement co-diminution est réalisée
15

(a) soit par utilisation de ligands, en particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal ou un fragment d'anticorps, chaque ligand étant spécifique d'un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, de préférence des V β s 16, 3 et 12, ou d'un ligand en
20 particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal, chaque ligand étant spécifique d'un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, de préférence les V β s 16, 7, 14 et 17,

(b) soit selon le protocole décrit ci-dessous en réalisant :

(i) une extraction des ARN totaux des cellules mononucléées
25 sanguines mises en présence de surnageant ou d'une fraction de surnageant de culture SEP et en présence de surnageant ou d'une fraction de surnageant de culture témoin,

(ii) une transcription inverse desdits ARN,

(iii) une amplification spécifique de chaque famille de V β s à
30 l'aide d'un couple d'amorces déterminé,

(iv) un marquage par tout marqueur approprié des produits d'amplification obtenus,

(v) une électrophorèse desdits produits d'amplification et analyse des profils d'électrophorèse obtenus, à l'aide d'un détecteur approprié.

La prédisposition à un état pathologique est évaluée en testant expérimentalement la sensibilisation immunologique d'un patient en mettant en évidence une expansion ou une perte majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et/ou 17 et éventuellement une co-expression ou une co-diminution de lymphocytes porteurs de V β s choisis parmi au moins l'un quelconque des V β 2 , 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, et préférentiellement des V β s 3 et 12 ou des V β s 7, 14 et 17, de préférence 7 et 17.

La prédisposition détectée peut être une prédisposition naturelle ou une prédisposition acquise, par exemple après une forte stimulation chez un individu des lymphocytes T porteurs des déterminants V β 16 ou V β 17, préférentiellement V β 16, par exposition de l'organisme de l'individu à un antigène. Cet antigène peut être par exemple au moins une protéine ou un peptide du virus de l'Hépatite B.

Aussi, la présente invention a pour objet un procédé de détection d'une pathologie ou d'une prédisposition à une pathologie selon lequel :

on met en évidence une expansion ou une perte majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et/ou V β 17, préférentiellement V β 16 ou expansion ou perte majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et une co-expansion ou co-diminution de lymphocytes porteurs de V β s des lymphocytes T choisis parmi au moins l'un quelconque des V β s 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, et préférentiellement les V β s 3 et 12 ou les V β s 7, 14 et 17, de préférence 7 et 17,

on calcule un pourcentage de variation du nombre des V β s détectées chez un patient atteint de SEP par rapport à celui obtenu avec les lymphocytes T d'un donneur sain, dans des conditions telles que déterminées précédemment.

5 Si le pourcentage de variation, en valeur absolue, est significativement différent de 0, on peut en déduire que le patient présente une prédisposition pour la maladie SEP et/ou développe la maladie. Si ce pourcentage est en valeur absolue égal à 0, cela peut signifier que le donneur ne présente pas de prédisposition pour la maladie SEP et/ou n'a
10 pas développé la maladie, au moment auquel le procédé a été appliqué.

L'invention a également pour objet, un procédé de détection d'un état pathologique ou d'une prédisposition à un état pathologique, dans un échantillon biologique, selon lequel on met en évidence au moins l'un des paramètres suivants :

15 une activité superantigénique, telle que définie précédemment,
une stimulation de la production de cytokines, telles que l'IL-6,
une induction d'apoptose cellulaire.

De préférence, on détecte au moins deux des paramètres en association, en particulier on détecte une activité superantigénique et une
20 induction d'apoptose ou une activité superantigénique et une stimulation de la production de cytokines.

De manière encore plus avantageuse, l'on détecte les trois paramètres en association.

L'état pathologique est en particulier associé à une maladie
25 auto-immune, telle que la sclérose en plaques.

L'activité superantigénique détectée selon les procédés de l'invention peut notamment être induite directement ou indirectement par un agent effecteur choisi parmi les protéines, les microorganismes, les agents pathogènes et par exemple les bactéries et/ou les rétrovirus tels que
30 MSRV-1 et/ou les agents pathogènes tels que MSRV-2.

L'invention concerne aussi un procédé de détection d'une activité superantigénique dans un échantillon biologique de patients atteints de sclérose en plaques, selon lequel on met en évidence une expansion majoritaire ou une perte significative de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 7. A cette fin, on peut procéder comme suit :

(i) on prélève un surnageant de culture de cellules mononucléées sanguines ou de cellules de plexus choroïdes ou de cellules leptoméningées, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune, ou d'une lignée cellulaire établie, telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 déposée à l'ECACC le 22 juillet 1992, sous le numéro 92072201 et LM7PC déposée à l'ECACC le 8 janvier 1993, sous le numéro 93010817, conformément aux dispositions du Traité de Budapest, et

(ii) on met en contact ledit surnageant de culture ou une partie du surnageant de culture avec une série de cultures, de préférence au moins trois, de cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains, et

(iii) on détecte ladite expansion et éventuellement une co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution des cellules mononucléées sanguines de l'étape (ii), comme décrit précédemment par utilisation d'un ligand ou par une amplification associée à une électrophorèse ;

ou

(i) on prélève des cellules mononucléées sanguines, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou de patients suspectés d'avoir un risque de développer une maladie auto-immune, en particulier la SEP, et d'individus sains,

(ii) on met en contact lesdites cellules mononucléées sanguines provenant des patients ou d'individus sains avec des surnageants de culture ou une fraction de surnageant de culture de cellules choisies parmi

les cellules mononucléées sanguines, les cellules de plexus choroïdes et les cellules leptoméningées, les cellules issues de lignées cellulaires établies, telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 déposée à l'ECACC le 22 juillet 1992, sous le numéro 92072201 et LM7PC déposée à l'ECACC le 8
5 janvier 1993, sous le numéro 93010817, conformément aux dispositions du Traité de Budapest, et

(iii) on détecte ladite expansion et éventuellement co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution à partir des cellules mononucléées sanguines de l'étape (i).

10 Les procédés tels que définis précédemment peuvent être utilisés pour le suivi thérapeutique de patients et/ou l'évaluation de l'efficacité de molécules à usage thérapeutique vis à vis de paramètres identifiés.

Pour évaluer l'efficacité de molécules à usage thérapeutique, c'est à dire une ou des molécule(s) susceptible(s) d'inhiber l'expansion ou
15 la perte des lymphocytes T d'un V β déterminé on prélève un surnageant de culture de cellules mononucléées sanguines ou de cellules de plexus choroïdes ou de cellules leptoméningées, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune, en particulier de SEP,

20 (i) on prélève des cellules mononucléées sanguines, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou suspectés d'avoir un risque de développer la maladie, en particulier la SEP et d'individus sains,

(ii) on met en contact lesdites cellules mononucléées sanguines
25 provenant de patients SEP ou d'individus sains avec des surnageants de culture ou une fraction de surnageant de culture de cellules choisies parmi les mononucléées sanguines, les cellules de plexus choroïdes, les cellules leptoméningées, les cellules issues de lignées cellulaires établies, telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 et LM7PC, et

(iii) on détecte l'inhibition de ladite expansion et éventuellement co-expansion ou l'inhibition de ladite perte et éventuellement co-diminution à partir des cellules mononucléées sanguines de l'étape (i), en présence dudit agent ou de ladite composition à des doses déterminées, des lymphocytes porteurs d'au moins un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, en particulier les V β s 16 et/ou 17, les V β s 16, 3 et 12 ou les V β s 16, 7, 14, et 17, en particulier les V β s 16, 7 et 17, par utilisation d'un ligand comme décrit précédemment ou d'une amplification associée à une électrophorèse comme décrit ci dessus.

On calcule ainsi un pourcentage de variation du nombre des V β s détectés en présence de la molécule ou des molécules à usage thérapeutique et en l'absence d'une telle ou de telles molécule(s).

La molécule ou les molécules à usage thérapeutique sont également testée(s) *in vivo* selon un procédé qui consiste à utiliser un surnageant de culture de cellules mononucléées, de préférence les lymphocytes B et les monocytes, ou de cellules de plexus choroïdes ou de cellules leptoméningées, lesdites cellules étant isolées à partir d'un échantillon biologique d'un patient atteint de SEP, ou à utiliser le surnageant d'une lignée cellulaire établie, telle que la lignée cellulaire PLI-2 et la lignée cellulaire LM7PC ou à utiliser tout ou partie d'au moins une molécule obtenue à partir d'au moins un des deux surnageants précités,

à mettre en contact tout ou partie d'au moins l'un des surnageants précités ou au moins une molécule contenue dans l'un au moins d'entre eux, avec une culture de cellules mononucléées sanguines, de préférence des lymphocytes T, prélevées chez un individu et/ou un animal avant et après administration de la ou des molécules à tester, et parallèlement après administration d'un agent et/ou composition placebo chez un patient SEP et chez un animal,

à mettre en évidence, comme décrit ci-dessus, l'expansion ou la perte des lymphocytes ayant le déterminant V β , avant et après

l'administration de la molécule ou des molécules à usage thérapeutique ou de l'agent et/ou composition placebo, chez l'individu et/ou l'animal,

à détecter ladite expansion et éventuellement une co-expansion et/ou la perte et éventuellement une co-diminution des lymphocytes T exprimant à leur surface une molécule V β donnée par utilisation d'au moins
5 un ligand ou par biologie moléculaire comme décrit précédemment, et

à calculer un pourcentage (X) d'expansion ou de perte de déterminants V β détectées dans les cellules mononucléées mises en culture et issues de l'individu ou de l'animal ayant reçu une ou plusieurs
10 administrations de la molécule ou des molécules à tester par rapport au nombre de déterminants V β détectés dans les cellules mises en culture et issues de l'individu ou de l'animal n'ayant reçu aucune administration et/ou un pourcentage (Y) d'expansion ou de perte de déterminants V β détectées dans les cellules mononucléées mises en culture et issues de l'individu ou
15 de l'animal ayant reçu une ou plusieurs administrations de la molécule ou des molécules à tester par rapport au nombre de déterminants V β détectés dans les cellules mises en culture et issues du patient ou de l'animal ayant reçu une ou des administration de molécule(s) et/ou d'une composition ou d'un agent placebo en respectant les mêmes conditions d'administration
20 que celle utilisées pour la ou les molécules à évaluer.

Si $|X|$ et/ou $|Y|$ et/ou $|X| + |Y|$ sont significativement différents de 0, cela peut signifier que la molécule ou les molécules inhibent totalement ou partiellement l'expansion ou la perte de cellules mononucléées avec le déterminant V β considéré; si $|X|$ ou $|Y|$ ou
25 $|X| + |Y|$ sont égaux ou proches de 0, cela peut signifier que l'agent n'inhibe pas totalement ou que partiellement l'expansion ou la perte de cellules mononucléées avec le déterminant V β considéré.

On entend par agent et/ou composition placebo, tout agent et/ou composition qui n'entraîne pas une diminution des cellules
30 mononucléées sanguines ayant le déterminant V β déterminé.

L'invention a également pour objet, un procédé d'évaluation de l'efficacité d'un agent et/ou d'une composition thérapeutique(s) dans un échantillon biologique, ou après administration à un patient ou un animal, vis-à-vis d'un état pathologique. Selon ce procédé on met en évidence une inhibition ou une diminution d'une activité superantigénique, telle que
5 définie précédemment.

L'efficacité thérapeutique d'un agent est déterminée en estimant l'inhibition ou la diminution de l'activité superantigénique qui est elle-même déterminée par l'inhibition de l'expansion et/ou la diminution ou par
10 l'inhibition et/ou la diminution des lymphocytes T porteurs de V β s déterminés.

Pour ce faire :

(i) on prélève un surnageant de culture ou une fraction de surnageant de culture de cellules mononucléées sanguines ou de cellules de plexus choroïdes ou de cellules leptoméningées, lesdites cellules provenant
15 de patients atteints d'une maladie auto-immune, en particulier la SEP, ou de cellules d'une lignée cellulaire établie, telles que les cellules des lignées PLI-2 et LM7PC,

(ii) on met en contact ledit surnageant de culture avec une série
20 de cultures de cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains en présence dudit agent ou de ladite composition à des doses prédéterminées, et

(iii) on détecte l'inhibition de ladite expansion et éventuellement co-expansion ou l'inhibition de ladite perte et éventuellement co-diminution
25 des lymphocytes porteurs d'au moins un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, en particulier les V β s 16 et/ou 17, les V β s 16, 3 et 12 ou les V β s 16, 7, 14, et 17, en particulier les V β s 16, 7 et 17, par utilisation d'un ligand ou d'une amplification associée à une électrophorèse comme décrit précédemment, ou

(i) on prélève des cellules mononucléées sanguines, lesdites cellules provenant de patients atteints de maladie auto-immune, en particulier des patients SEP, et d'individus sains,

(ii) on met en contact lesdites cellules mononucléées sanguines
5 provenant de patients et d'individus sains avec des surnageants de culture ou une fraction de surnageant de culture de cellules choisies parmi les mononucléées sanguines, les cellules de plexus choroïdes et les cellules leptoméningées, les cellules issues de lignées cellulaires établies, telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 et LM7PC, et

10 (iii) on détecte l'inhibition de ladite expansion et éventuellement co-expansion ou l'inhibition de ladite perte et éventuellement co-diminution à partir des cellules mononucléées sanguines de l'étape (i), en présence dudit agent ou de ladite composition à des doses déterminées, des lymphocytes porteurs d'au moins un déterminant choisi parmi les V β s 16,
15 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, en particulier les V β s 16 et/ou 17, les V β s 16, 3 et 12 ou les V β s 16, 7, 14, et 17, en particulier les V β s 16, 7 et 17, par utilisation d'un ligand comme décrit précédemment ou d'une amplification associée à une électrophorèse comme décrit précédemment.

L'efficacité thérapeutique de plusieurs agents et/ou
20 compositions peut être évaluée en combinaison dans un même essai.

Un procédé *in vivo* avantageux pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique dans la sclérose en plaques comprend les étapes suivantes :

on détermine les pourcentages X et Y comme décrit et défini ci-
25 dessus. X et Y sont déterminés après administration d'un agent et/ou composition à évaluer dans un patient atteint de la SEP,

on détermine de même X' et Y'; ils sont déterminés comme X et Y respectivement, mais après administration du même composé dans un individu sain,

on calcule les pourcentages x et y , avec $x = X/X'$ et $y = Y/Y'$. Ces pourcentages reflètent la diminution du nombre de cellules mononucléées sanguines présentant le déterminant $V\beta$ due à l'administration du composé thérapeutique à tester chez un patient atteint de sclérose en plaques par rapport à un individu sain.

Si $|x|$ et/ ou $|y|$ et/ou $|x| + |y|$ sont significativement différents de 0, cela peut signifier que l'agent et/ou la composition testés à un effet thérapeutique vis-à-vis de la pathologie SEP ; Si $|x|$ et/ou $|y|$ et/ou $|x| + |y|$ sont égaux ou proches de 0, cela peut signifier que l'agent et/ou la composition testés n'a pas ou très peu d'effet thérapeutique vis-à-vis de la pathologie SEP.

L'invention a encore pour objet une composition à usage thérapeutique et/ou prophylactique qui comprend, entre autres, un agent thérapeutique capable d'inhiber une activité superantigénique dans un échantillon biologique, telle que définie précédemment, éventuellement en association avec un véhicule et/ou un excipient et/ou un adjuvant et/ou un diluant pharmaceutiquement acceptables, c'est à dire qui permettent l'administration à l'animal et à l'être humain. Toutes ces données font partie des connaissances générales de l'homme du métier. (voir par exemple Remington's Pharmaceutical Sciences 16th ed. 1980, Mack Publishing Co). Le véhicule pharmaceutiquement acceptable est préférentiellement isotonique, hypotonique ou présente une faible hypertonicité et présente une force ionique relativement basse, tel que par exemple une solution de sucre. Par ailleurs, ladite composition peut contenir des solvants, des véhicules aqueux ou partiellement aqueux tels que de l'eau stérile, libre d'agents pyrogène et des milieux de dispersion par exemple. Le pH de ces compositions pharmaceutiques est convenablement ajusté et tamponné selon les techniques conventionnelles.

On entend par efficacité thérapeutique le bénéfice clinique et biologique acquis après administration d'un agent thérapeutique en vue

d'une amélioration, voire d'une guérison de la maladie. Ce bénéfice se traduit entre autre par une diminution des signes cliniques, biologiques et des effets pathologiques de la maladie après une analyse clinique par le médecin et/ou des analyses biologiques, telles que l'imagerie par résonance magnétique, analyse des bandes oligoclonales dans liquide céphalorachidien, analyse de potentiels... Cette diminution de signes cliniques et effets pathologiques doit entraîner un bénéfice pour le patient (Schwartz et Lazar, 1995, Elements de statistique médicale et biologique, eds Flammarion ; Lazar et Schwartz, 1995, Elements de statistique médicale et biologique, eds Flammarion). La maladie étudiée de préférence est la sclérose en plaques. Ces agents thérapeutiques sont capables (i) d'influencer de manière qualitative et/ou quantitative l'activité superantigénique telle que décrite dans la présente invention et/ou (ii) de moduler et/ou d'inhiber l'expression des déterminants V β s identifiés dans la présente invention. Différents agents thérapeutiques sont produits en suivant des approches classiques largement décrites dans la littérature. Les différents groupes d'agents thérapeutiques envisageables dans la présente invention sont décrits ci-dessous.

Comme défini précédemment, l'agent thérapeutique est capable d'inhiber ou de diminuer une activité superantigénique, telle que définie dans la présente invention, pour un ou des V β s déterminés. L'agent thérapeutique consiste en un matériel chimique ou biologique ou en une composition qui présente une efficacité thérapeutique qui peut être mise en évidence selon les modalités décrites précédemment. Pour la simplicité de l'exposé, on parlera généralement de molécules d'intérêt de l'invention pour désigner le ou les différents V β s associé(s) à l'activité superantigénique.

Par agent thérapeutique on entend :

- au moins une molécule naturelle et/ou une molécule recombinante ou leurs fragments dont la séquence correspond à tout ou partie de la séquence des molécules d'intérêt, c'est à dire :

- au moins une protéine naturelle et/ou une protéine recombinante et/ou un polypeptide de synthèse choisi parmi les molécules d'intérêt de l'invention,

5 - au moins un fragment naturel et/ou synthétique de ces molécules d'intérêt, par exemple un fragment immunogène capable d'induire une réponse immune contre un polypeptide issu d'au moins une des molécules d'intérêt de l'invention,

10 - au moins un peptide mimotope défini à partir des séquences des molécules d'intérêt de l'invention, ou une combinaison de mimotopes, capable d'induire une réponse immune contre un polypeptide issu d'au moins une des molécules d'intérêt de l'invention,

- au moins une protéine ou un peptide pouvant réguler *in vivo* la transcription et/ou la traduction des molécules d'intérêt de l'invention et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences.

15 La réponse immune dirigée contre un antigène spécifique peut être divisée en deux catégories distinctes, l'une mettant en jeu les anticorps (réponse immune de type humorale), l'autre les cellules effectrices cytotoxiques telles que par exemple les macrophages, les lymphocytes cytotoxiques (CTL) ou les cellules tueuses (NK) ainsi que les
20 lymphocytes T " helper ", notamment les lymphocytes T CD4+ (réponse immune de type cellulaire). Plus particulièrement, les deux types de réponse se distinguent en ce que les anticorps reconnaissent les antigènes sous leur forme tridimensionnelle alors que les lymphocytes T, par exemple, reconnaissent des portions peptidiques desdits antigènes, associés à des
25 glycoprotéines codées par les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), notamment les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de type I qui sont exprimés de façon ubiquitaire à la surface des cellules ou les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de type II qui sont exprimés de façon spécifique à la surface des cellules
30 impliquées dans la présentation des antigènes (APC). 1) Selon un premier

aspect, la réponse immune de type cellulaire est caractérisée en ce que les cellules T de type CD4+ (cellules T « helper »), suite à un phénomène d'activation bien connu (pour une revue voir Alberola-lia 1997, Annu Rev Immunol 15, 125-154) produisent des cytokines qui à leur tour induisent la
5 prolifération de cellules APC capables de produire lesdites cytokines, la différenciation cellulaire des lymphocytes B capables de produire des anticorps spécifiques de l'antigène, et la stimulation des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). 2) Selon un second aspect de la réponse immune cellulaire, les cellules effectrices cytotoxiques telles que par exemple les
10 lymphocytes de type CD8+ (CTL) sont activés a) après interaction avec des peptides antigéniques fixés sur et présentés par les glycoprotéines portées par les cellules ubiquitaires et codées par les gènes appartenant au système CMH, et b) éventuellement par les cytokines produites par les CD4+.

15 A partir de la séquence en acides aminés des molécules d'intérêt de l'invention, des séquences peptidiques de ces molécules ou des fragments de séquences peptidiques de ces molécules, correspondant à tout ou partie de la séquence primaire de ces molécules et peuvent être synthétisés par des méthodes classiques de synthèse peptidique ou
20 obtenus par recombinaison génétique.

Des protéines recombinantes correspondantes aux molécules d'intérêt de l'invention, produites dans un système cellulaire procaryote ou eucaryote, peuvent être produite par l'homme du métier à partir de la connaissance des séquences des gènes correspondants décrits dans la
25 littérature et en tenant compte de la dégénérescence du code génétique. Toutes les séquences protéiques identifiées dans la présente invention sont ainsi susceptibles d'être obtenues par recombinaison génétique. Les gènes sont clonés dans des vecteurs adaptés. Des vecteurs différents sont utilisés pour transformer des cellules procaryotes (par exemple *E. coli*) et
30 des cellules eucaryotes (par exemple cellules COS, CHO et cellules Simliki).

Les protéines recombinantes correspondant aux molécules d'intérêt de l'invention ou à des fragments de ces protéines peuvent être ainsi produits dans des systèmes cellulaires procaryotes et/ou encaryotes. Dans les cellules *E. coli*, les protéines recombinantes sont produites avec une queue poly-histidine. La fraction protéique insoluble est solubilisée dans de l'urée 8M. L'enrichissement du produit est effectué sur résine chélatée au nickel (Qiagen). La colonne est lavée avec des concentrations décroissantes d'urée. L'élution est réalisée avec de l'imidazole en l'absence d'urée. La séquence complète des molécules d'intérêt de l'invention peut être également clonée dans un plasmide adapté puis transférée dans le virus de la vaccine pour obtenir un virus recombinant ;

- au moins un ligand spécifique d'au moins une desdites molécules d'intérêt de l'invention ou de leurs fragments qui est capable de se fixer aux molécules d'intérêt ou aux récepteurs desdites molécules d'intérêt ou encore d'interférer pour la liaison de la molécule d'intérêt à la cellule présentatrice d'antigène et d'inhiber l'activité superantigénique, c'est à dire :

- au moins un anticorps ou fragment d'anticorps polyclonal ou monoclonal spécifique d'au moins une desdites molécules d'intérêt de l'invention ou de leurs fragments. Cet anticorps peut être ou non neutralisant, c'est-à-dire capable ou non d'inhiber l'activité de la protéine d'intérêt. Le ligand peut être choisi parmi toute molécule ou fragment de molécule capable de se fixer aux molécules d'intérêt, par exemple des récepteurs, des co-facteurs de ces molécules, des anticorps polyclonaux ou monoclonaux capables de se fixer aux molécules d'intérêt ou à tout fragment.

Ces anticorps sont très utiles notamment pour permettent la mise en œuvre de compositions thérapeutiques car ils conduisent par exemple, à des réactions immunes, dirigées spécifiquement à l'encontre d'épitopes immunodominants ou contre des antigènes présentant une

grande variabilité. On administre chez le patient soit des anticorps solubles neutralisants pour inhiber leur fonction, soit des anticorps solubles spécifiques pour éliminer le peptide par formation de complexes immuns. L'invention décrit l'utilisation d'anticorps capables de reconnaître spécifiquement au moins une molécule d'intérêt décrite dans la présente invention pour le traitement et /ou pour le suivi thérapeutique de maladie, de préférence la sclérose en plaques. Ces anticorps sont polyclonaux et de préférence monoclonaux. De préférence ces anticorps inhibe la fonction de la protéine en se fixant. La capacité de l'anticorps à se fixer spécifiquement à la protéine est analysée par des techniques conventionnelle décrites, comme par exemple par des tests ELISA ou de Western Blot en utilisant la molécule ou le peptide immunogène naturel ou synthétique. Le titre de l'anticorps est alors déterminé. La capacité de l'anticorps à neutraliser la fonction de la protéine peut être analysée par différents moyen, par exemple en déterminant la diminution de l'activité de la molécule ou du peptide immunogène en présence de l'anticorps.

Par exemple, les anticorps monoclonaux dirigés contre une molécule d'intérêt de l'invention ou une partie de cette molécule sont produits par des techniques conventionnelles utilisées pour produire des anticorps contre des antigènes de surface. Des souris ou des lapins sont immunisées (i) soit avec la protéine naturelle ou recombinante d'intérêt, (ii) soit avec tout peptide immunogène de cette protéine d'intérêt, (iii) soit avec des cellules murines qui expriment la protéine ou le peptide d'intérêt et les molécules du CMHII. La lignée murine Balb/c est la plus fréquemment utilisée. L'immunogène peut être également un peptide choisi parmi les peptides définis à partir des séquences primaires des molécules d'intérêt. Les protéines ou peptides sont couplés à l'hémocyanine de Lymphet Keyhole, en abrégé peptide-KLH, comme support pour son utilisation en immunisation, ou couplé à de l'albumine de sérique humaine, en abrégé peptide-HSA. Les animaux sont soumis à une injection de peptide -KLH ou

de peptide -HSA en utilisant de l'adjuvant complet de Freund (IFA). Les sérums et les surnageants de culture d'hybridome issus des animaux immunisés avec chaque peptide sont analysés pour la présence d'anticorps anti-molécules par un test ELISA utilisant les molécules initiales. Les
5 cellules spléniques de ces souris sont récupérées et fusionnées avec des cellules de myélome. Le polyéthylèneglycol (PEG) est l'agent de fusion le plus fréquemment utilisé. Les hybridomes produisant les anticorps les plus spécifiques et les plus sensibles sont sélectionnés. Les anticorps monoclonaux peuvent être produits *in vitro* par culture cellulaire des
10 hybridomes produits ou par récupération de liquide d'ascite murin après injection intrapéritonéale des hybridomes chez la souris. Quel que soit le mode de production en surnageant ou en ascite, il importe ensuite de purifier l'anticorps monoclonal. Les méthodes de purification utilisées sont essentiellement la filtration sur gel échangeur d'ions ou par
15 chromatographie d'exclusion, voire l'immunoprécipitation. Pour chaque anticorps il faut choisir la méthode qui permettra d'obtenir le meilleur rendement. Un nombre suffisant d'anticorps anti-protéines sont criblés dans des tests fonctionnels pour identifier les anticorps les plus performants pour fixer la molécule d'intérêt et/ou pour bloquer l'activité de
20 la molécule d'intérêt. Les anticorps monoclonaux sélectionnés sont humanisés par des méthodes standard de " CDR grafting " (protocole réalisé par de nombreuses compagnies, sous forme de service). Ces anticorps humanisés peuvent être testés cliniquement chez le patient. L'efficacité de ces anticorps peut être suivie par des paramètres cliniques.

25 La production *in vitro* d'anticorps, de fragments d'anticorps ou de dérivés d'anticorps, tels que les anticorps chimères humanisés ou non, produits par génie génétique, dans des cellules eucaryotes a été décrite (EP 120 694 ou EP 125 023) et est aussi applicable à la présente invention,

- au moins une molécule inhibitrice de la fonction d'au moins une molécule choisie parmi les molécules d'intérêt de l'invention ou leurs fragments,

5 - au moins une molécule régulatrice de l'expression d'au moins une molécule choisie parmi les molécules d'intérêt de l'invention ou leurs fragments, par exemple pour bloquer la transcription ou la traduction de ces molécules,

10 - au moins une molécule régulatrice du métabolisme d'au moins une protéine choisie parmi les molécules d'intérêt de l'invention ou leurs fragments,

- au moins une molécule régulatrice de l'expression et/ou du métabolisme d'un ligand d'au moins une protéine choisie parmi les molécules d'intérêt de l'invention ou leurs fragments, par exemple un récepteur ou un co-facteur ;

15 - au moins une séquence d'acides nucléiques comprenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique dont la séquence nucléique est déduite des séquences d'ADN et d'ARN codant pour tout ou partie des molécules d'intérêt de l'invention, en association avec des éléments assurant l'expression dudit gène d'intérêt thérapeutique *in vivo* dans des
20 cellules cibles destinées à être génétiquement modifiées par la séquence nucléique du gène d'intérêt thérapeutique. Les gènes peuvent être non mutés ou mutés. Ils peuvent également consister en des acides nucléiques modifiés de sorte qu'il ne leur est pas possible de s'intégrer dans le génome de la cellule cible, ou d'acides nucléiques stabilisés à l'aide d'agents, tels
25 que la spermine. Un tel gène d'intérêt thérapeutique code notamment pour :

- au moins pour une protéine choisie parmi les molécules d'intérêt identifiées dans la présente invention ou leurs fragments, et/ou

30 - au moins pour un ligand ou toute partie d'un ligand capable de se fixer à au moins une protéine ou un fragment de protéine choisi parmi

les molécules d'intérêt identifiées dans la présente invention ou leurs fragments, pouvant inhiber ou non la fonction de la molécule d'intérêt, et/ou

- au moins pour tout ou partie d'un anticorps polyclonal ou monoclonal capable de se fixer à au moins une protéine ou un fragment de protéine choisi parmi les molécules d'intérêt identifiées dans la présente invention ou leurs fragments, pouvant inhiber ou non la fonction de la molécule d'intérêt. Il peut notamment s'agir d'anticorps transmembranaire natif, ou de fragment ou dérivé d'un tel anticorps, pour autant que ledit anticorps, fragment ou dérivé d'anticorps soit exprimé à la surface de la cellule cible du mammifère génétiquement modifiée et soit capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T " helper " impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule, et/ou

- au moins pour une molécule inhibitrice d'au moins une protéine ou de ses fragments, ladite protéine étant choisie parmi les molécules d'intérêt identifiées dans la présente invention, pouvant inhiber la fonction et/ou le métabolisme et/ou la fixation des molécules d'intérêt ou de leurs fragments.

Par ailleurs, ledit acide nucléique peut comprendre au moins deux séquences, identiques ou différentes, présentant une activité de promoteur transcriptionnel et/ou au moins deux gènes, identiques ou différents, situés l'un par rapport à l'autre de manière contiguë, éloignée, dans le même sens ou dans le sens inverse, pour autant que la fonction de promoteur transcriptionnel ou la transcription desdits gènes ne soit pas affectée.

De même dans ce type de construction d'acide nucléique, il est possible d'introduire des séquences nucléiques " neutres " ou introns qui ne nuisent pas à la transcription et sont épissées avant l'étape de

traduction. De telles séquences et leurs utilisations sont décrites dans la littérature (référence : demande de brevet PCT WO 94/29471).

Ledit acide nucléique peut également comprendre des séquences requises pour le transport intracellulaire, pour la réplication et/ou pour l'intégration, pour la transcription et/ou la traduction. De telles séquences sont bien connues de l'homme de l'art.

Par ailleurs, les acides nucléiques utilisables selon la présente invention peuvent également être des acides nucléiques modifiés de sorte qu'il ne leur est pas possible de s'intégrer dans le génome de la cellule cible, ou des acides nucléiques stabilisés à l'aide d'agents, tels que par exemple la spermine, qui en tant que tels n'ont pas d'effet sur l'efficacité de la transfection.

La séquence d'acide nucléique est de préférence une séquence d'ADN ou ARN nue, c'est à dire libre de tout composé facilitant son introduction dans les cellules (transfert de séquence d'acide nucléique). Toutefois, selon un second mode de réalisation de l'invention, afin de favoriser son introduction dans les cellules cibles et afin d'obtenir les cellules génétiquement modifiées de l'invention, cette séquence d'acide nucléique peut être sous la forme d'un " vecteur ", et plus particulièrement sous la forme d'un vecteur viral, tel que par exemple un vecteur adénoviral, rétroviral, un vecteur dérivé d'un poxvirus, notamment dérivé du virus de la vaccine ou du Modified Virus Ankara (MVA) ou d'un vecteur non viral tel que, par exemple, un vecteur consistant en au moins une dite séquence d'acide nucléique complexée ou conjuguée à au moins une molécule ou substance porteuse sélectionnée parmi le groupe consistant en un amphiphile cationique, notamment un lipide cationique, un polymère cationique ou neutre, un composé polaire pratiquement choisi parmi le propylène glycol, le polyéthylène glycol, le glycérol, l'éthanol, la 1-méthyl-L-2-pyrrolidone ou leurs dérivés, et un composé polaire aprotique notamment choisi parmi le diméthylsulfoxyde (DMSO), le diéthylsulfoxyde, le

di-n-propylsulfoxide, le diméthylsulfone, le sulfolane, la diméthylformamide, le diméthylacetamide, la tetraméthylurée, l'acétonitrile ou leurs dérivés. La littérature procure un nombre important d'exemples de tels vecteurs viraux et non viraux.

5 De tels vecteurs peuvent en outre et de préférence comprendre des éléments de ciblage pouvant permettre de diriger le transfert de séquence d'acide nucléique vers certains types cellulaires ou certains tissus particuliers tels que les cellules T helpers, les cellules T cytotoxiques et les cellules présentatrices de l'antigène. Ils peuvent également permettre de
10 diriger le transfert d'une substance active vers certains compartiments intracellulaires préférés tel que le noyau, les mitochondries ou les peroxysomes, par exemple. Il peut en outre s'agir d'éléments facilitant la pénétration à l'intérieur de la cellule ou la lyse de compartiments intracellulaires. De tels éléments de ciblage sont largement décrits dans la
15 littérature. Il peut par exemple s'agir de tout ou partie de lectines, de peptides, notamment le peptide JTS-1 (voir demande de brevet PCT WO 94/40958), d'oligonucléotides, de lipides, d'hormones, de vitamines, d'antigènes, d'anticorps, de ligands spécifiques de récepteurs membranaires, de ligands susceptibles de réagir avec un anti-ligand, de
20 peptides fusogènes, de peptides de localisation nucléaire, ou d'une composition de tels composés,

ou encore

- au moins une séquence d'acides nucléiques capable de s'hybrider à une séquence d'acides nucléiques codant pour les molécules
25 d'intérêt de l'invention ou leurs fragments. Les fragments correspondent en particulier à des molécules anti-sens ou ribozyme et peuvent être synthétisés à l'aide de synthétiseurs automatiques, tels que ceux commercialisés par la société Applied Biosystem. Les oligonucléotides anti-sens sont capables d'interférer spécifiquement avec la synthèse d'une
30 protéine cible d'intérêt, par inhibition de la formation et/ou du

fonctionnement du polysome selon le positionnement de l'ARNm dans la cible. Donc le choix fréquent de la séquence entourant le codon d'initiation de la traduction comme cible pour une inhibition par un oligonucléotide anti-sens vise à prévenir la formation du complexe d'initiation. D'autres mécanismes dans l'inhibition par des oligonucléotides anti-sens impliquent
5 une activation de la ribonucléase H qui digère les hybrides oligonucléotide anti-sens/ARNm ou une interférence au niveau de sites d'épissage par des oligonucléotides anti-sens dont la cible est un site d'épissage de l'ARNm. Les oligonucléotides anti-sens sont également complémentaires de
10 séquences ADN et peuvent donc interférer au niveau de la transcription par la formation d'une triple hélice, l'oligonucléotide anti-sens s'appariant par des liaisons hydrogène dites de Hoogsteen au niveau du grand sillon de la double hélice d'ADN. Dans ce cas particulier, on parle plus précisément d'oligonucléotides antigènes. Il est bien entendu que les oligonucléotides
15 anti-sens peuvent être strictement complémentaires de la cible ADN ou ARN à laquelle ils doivent s'hybrider, mais aussi non strictement complémentaires à la condition qu'ils s'hybrident à la cible. De même, il peut s'agir d'oligonucléotides anti-sens non modifiés ou modifiés au niveau des liaisons inter-nucléotidiques. Toutes ces notions font partie des
20 connaissances générales de l'homme de l'art. Bien entendu, de telles molécules anti-sens peuvent constituer en tant que telles des vecteurs. On peut également utiliser des vecteurs qui comprennent une séquence d'acides nucléique qui code pour un anti-sens. Ces molécules d'acides nucléiques sont capables de s'hybrider dans des conditions stringentes à
25 l'ADN ou/et ARN codant pour les protéines de l'invention ou pour leur(s) fragment(s). Des conditions de stringence caractéristiques sont celles qui correspondent à une combinaison de la température et de la concentration saline choisie approximativement entre 12 à 20°C sous le Tm (« melting temperature ») de l'hybride à l'étude. De telles molécules sont synthétisées
30 et peuvent être marquées en utilisant des méthodes de marquage

conventionnelles utilisées pour les sondes moléculaires, ou peuvent être utilisées comme amorces dans les réactions d'amplification. Les séquences qui présentent au moins 90% d'homologie par rapport à une séquence de référence font également partie de l'invention, de même que les fragments de ces séquences qui présentent au moins 20 nucléotides et de préférence 30 nucléotides contigus homologues par rapport à une séquence de référence.

Les molécules ou séquences d'acides nucléiques ADN ou ARN consistent en un fragment d'ADN et/ou d'ARN, double brin ou simple brin, linéaire ou circulaire, naturel et isolé ou de synthèse, correspondant à un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, et permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique choisi dans le groupe consistant en un ADNc ; un ADN génomique ; un ADN plasmidique ; un ARN messager. Les séquences d'acides nucléiques sont déduites de la séquence d'acides aminés des molécules d'intérêt de l'invention ou de leurs fragments, en utilisant le code génétique. En raison de la dégénérescence du code génétique l'invention englobe également des séquences équivalentes ou homologues. Ces séquences définies permettent à l'homme de l'art de définir lui-même les molécules adaptées. Il peut ainsi définir et utiliser des molécules d'acides nucléiques complémentaires des séquences ADN et/ou ARN codant pour les molécules d'intérêt de l'invention ou de leur(s) fragment(s).

Ces séquences d'acides nucléiques et/ou vecteurs permettent de cibler les cellules dans lesquelles la protéine ou le fragment de protéine est exprimé, soit par utilisation de molécule de ciblage introduite sur le vecteur, soit par l'utilisation d'une propriété particulière de la cellule ;

- au moins une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement au moins une molécule d'intérêt de l'invention ou tout fragment de ces molécules, ou des anticorps spécifiques d'au moins une desdites molécules d'intérêt de l'invention ou de ses fragments, ladite

cellule de mammifère étant génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une séquence d'acide nucléique ou un fragment d'une séquence nucléique ou une association de séquences d'acides nucléiques correspondant à des fragments d'acides nucléiques issus d'un même gène ou de gènes
5 différents, la ou lesdites séquences nucléiques étant déduite(s) des séquences d'ADN et d'ARN codant pour les molécules d'intérêt de l'invention ou tout fragment, ledit gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie de la molécule d'intérêt de l'invention, d'un fragment de la molécule ou d'un anticorps spécifique de la molécule qui sera exprimé à la
10 surface de ladite cellule de mammifère (Toes et al., 1997, PNAS 94 : 14660-14665). Ainsi, ladite cellule contient au moins un gène qui code *in vivo* pour :

- au moins une protéine choisie parmi les molécules d'intérêt de l'invention et/ou leurs fragments, et/ou
- 15 - au moins un peptide défini à partir de la séquence primaire d'au moins une protéine choisie parmi les molécules d'intérêt de et/ou leurs fragments, et/ou
- au moins toute molécule inhibitrice de l'activité et/ou de la fixation et/ou de l'expression de ces molécules, et/ou
- 20 - au moins un peptide issu de la séquence primaire d'une protéine choisie parmi les molécules d'intérêt de l'invention et/ou leurs fragments, et capable de se fixer sur au moins une glycoprotéine du CMHI et/ou CMHII, et/ou
- au moins un ligand et/ou tout anticorps et/ou toute partie
25 d'anticorps capable de se fixer à au moins une protéine choisie parmi les molécules d'intérêt de l'invention et/ou les fragments.

Plus particulièrement, ladite cellule cible provient soit du mammifère à traiter, soit d'un autre mammifère que celui à traiter. Dans ce dernier cas, il convient de noter que ladite cellule cible aura subi un
30 traitement la rendant compatible avec le mammifère à traiter. Selon un

aspect préféré, par "mammifère" on entend désigner un mammifère humain. Ces cellules sont établies en lignées cellulaires et sont préférentiellement CMHII+ ou CMHII- inductibles comme les lymphocytes, les monocytes, les astrocytes, les oligodendrocytes.

5 L'invention concerne également les cellules modifiées et un procédé de préparation d'une cellule telle que décrite ci dessus caractérisé en ce que l'on introduit dans une cellule de mammifère par tout ou moyen approprié, au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit
10 gène dans ladite cellule, ledit gène d'intérêt thérapeutique contenant une séquence d'acide nucléique codant pour une molécule ou un fragment de molécule *in vivo*, comme décrit juste ci-dessus. Plus particulièrement, elle concerne des cellules procaryotes, des cellules de levure et des cellules animales, en particulier des cellules de mammifères transformées par au
15 moins une séquence nucléotidique et/ou un vecteur tel que décrit précédemment.

Selon un mode de réalisation particulier, les cellules (cellules dendritiques, macrophages, astrocytes, lymphocytes T CD4+, lymphocytes T CD8+) du patient ou allogéniques sont placées en contact
20 d'une préparation purifiée du polypeptide cible, celui-ci étant internalisé, apprêté et présenté à la surface cellulaire associé aux molécules du CMHI et/ou CMHII. Elles peuvent entre autre induire une réponse immune spécifique contre le peptide. Les cellules " activées " sont ensuite administrées au patient, chez lequel elles peuvent entre autre induire une
25 réponse immune spécifique des antigènes (on utilise une voie naturelle de la réponse immune, mais on contrôle ce que la cellule présentatrice de l'antigène va présenter)

Selon un mode de réalisation particulier, les cellules présentatrices d'antigène (cellule dendritique, macrophage, astrocytes,...)
30 sont modifiées *in vitro* pour exprimer les antigènes dans la cellule

transformée, qui peuvent être sécrétées par la cellule et/ou s'associer aux molécules du CMHI et/ou CMHII et être présentées à la surface des cellules pour induire chez le patient chez lequel on administre la cellule modifiée une réaction immune parfaitement ciblée.

5 Toutes les approches vaccinales ne sont pas toujours satisfaisantes et conduisent par exemple à des réactions immunes limitées dirigées uniquement à l'encontre d'épitopes immunodominants ou contre des antigènes présentant une grande variabilité. De même la présentation incorrecte des antigènes par les glycoprotéines du système CMH à la

10 surface des cellules, ne permet pas de développer chez le patient traité une immunité anti-protéine d'intérêt convenable. Afin de pallier ces problèmes, certains auteurs ont proposé dans le cadre de tels procédés vaccinaux, de sélectionner les fragments minimaux antigéniques correspondant aux

15 portions de peptide susceptibles d'être reconnus spécifiquement par les lymphocytes T cytotoxiques, de les exprimer dans les cellules afin qu'ils s'associent aux molécules du CMHI et soient présentés à la surface des cellules pour induire chez le patient traité une réaction immunitaire parfaitement ciblée (Toes et al. 1997, PNAS 94 : 14660-14665). Plus

20 particulièrement, il a été montré que des épitopes de très petites tailles (variant de 7 à environ 13 acides aminés) qui sont exprimés à partir de minigènes introduits dans un virus de la vaccine, pouvaient induire une immunisation de type cellulaire. Il a par ailleurs été montré que plusieurs minigènes pouvaient être exprimés conjointement à partir d'un même vecteur (cette construction particulière est appelée 'string of beads'). Une

25 telle construction présente l'avantage d'induire une réaction immune de type CTL synergique (Whitton et al ; 1993 J. of Virology 67 : 348-352).

Protocole de mise en contact des cellules et du fragment antigénique :

La présentation des fragments antigéniques par les molécules

30 CMHI et/ou CMHII repose sur un procédé intracellulaire identifié (voir

Groettrup et al., 1996 Immunology Today 17 : 429-435 pour une revue) au cours duquel des peptides antigéniques de très courtes tailles (environ 7-13 acides aminés) sont produits par dégradation d'un polypeptide plus complexe contre lequel la réaction immune finale sera dirigée. Ces courts peptides sont ensuite associés aux molécules du CMH I ou du CMH II pour former un complexe protéique qui est transporté à la surface cellulaire afin de présenter lesdits peptides aux lymphocytes T cytotoxiques circulants ou aux lymphocytes T helper circulants, respectivement. Il convient en outre de noter que la spécificité des molécules CMH I ou CMH II vis-à-vis des peptides antigéniques varie en fonction des molécules CMH I ou CMH II (exemple pour le CMH I : HLA-A, HLA-B, ...) et de l'allèle (exemple pour le CMH I : HLA-A2, HLA-A3, HLA-A11) considérés. Au sein d'une même espèce animale, d'un individu à l'autre, il existe une grande variabilité des gènes codant pour les molécules du système CMH (à ce sujet, voir notamment George et al., 1995, Immunology Today 16 : 209-212).

Selon un mode de réalisation particulier, les cellules, telles que les cellules dendritiques, les macrophages, les astrocytes, les lymphocytes T CD4+, les lymphocytes T CD8+, sont modifiées de manière à exprimer à leur surface des anticorps spécifiques du peptide ciblé. Le peptide est neutralisé par les anticorps exprimés à la surface des cellules. Ces cellules sont de préférence immunes, de préférence du patient, de préférence cytotoxiques, modifiées pour exprimer tout ou partie d'un anticorps spécifique du polypeptide cible.

Isolement de cellules mononucléées à partir de sang périphérique :

En 1968, Boyum décrit une technique rapide qui permet par centrifugation du sang sur gradient de densité, de séparer les cellules mononucléées (lymphocytes et monocytes) avec un bon rendement (rendement théorique 50%, c'est-à-dire 10^6 cellules /ml de sang). 50 ml de sang périphérique prélevés stérilement dans des tubes héparinés sont

centrifugés 20 minutes à 150g à 20°C. Les cellules récupérées sont diluées dans deux volumes de sang périphérique initial de PBS stérile. 10 ml de cette suspension sont déposés sur 3ml d'une solution de ficoll-Hypaque (milieu de séparation des lymphocytes, Flow). Après centrifugation
 5 pendant 20 minutes à 400g et 20°C sans freinage de décélération, les cellules mononucléées sédimentent à l'interface PBS-Ficoll, en une couche dense, opalescente, alors que la quasi-totalité des globules rouges et des polynucléaires sédimentent au fond du tube. Les cellules mononucléées sont récupérées et lavées en PBS stérile.

10 Internalisation des antigènes par les cellules présentatrices de l'antigène :

Traitement préalable des cellules présentatrices de l'antigène : les cellules présentatrices de l'antigène sont préalablement lavées avec un tampon PBS-BSA à 0.5% (p/v) puis énumérées puis elle sont préincubées
 15 en présence de différents inhibiteurs de réduction trois fois en PBS-BSA 0.5% contenant de 10 μ M à 10 mM final de DTNB (acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque) ou de NEM (N-éthylmaléimide). Les étapes ultérieures de fixation d'antigènes à la surface cellulaire ou d'internalisation d'antigènes se réalisent aussi en présence des différentes concentrations d'inhibiteurs.

20 Protocole d'internalisation des antigènes par les cellules présentatrices de l'antigène :

8.10⁶ cellules sont incubées en présence de quantité saturante de protéines radiomarquées à l'iode 125 (1 μ g) dans des micropuits dans 70 μ l. Après une heure d'incubation à 4°C sous agitation, les antigènes
 25 sont fixés à la surface des cellules. La suspension cellulaire est lavée deux fois en PBS-BSA et les culots cellulaires sont repris dans 70 μ l de tampon et incubées à 37°C pendant différentes périodes allant jusqu'à 2 heures. Cellules et surnageants sont séparés par centrifugation à 800g pendant 5 minutes 4°C. Pour des plus longues périodes d'incubation, l'étape
 30 préliminaire de pré-fixation des antigènes à la surface des cellules est

supprimée. Les cellules sont diluées dans un milieu RPMI-10% SVF en présence de 20 mM Hépès, à 10^6 cellules /ml. Les cellules sont incubées en présence d'un excès d'antigène pendant différentes périodes à 37°C (1 μ g de molécules / $5 \cdot 10^7$ cellules monocytes/macrophages ou / 10^8 cellules B-EBV).

A partir des connaissances des séquences en acides aminés des protéines d'intérêt de l'invention, il est à la portée de l'homme de l'art de définir et utiliser les molécules décrites ci-dessus et/ou toute molécule capable de se fixer aux dites molécules, et/ou toute molécule capable d'inhiber l'activité desdites molécules d'intérêt.

L'agent thérapeutique est de préférence choisi parmi une molécule naturelle et/ou une molécule recombinante, ou un fragment desdites molécules, dont la séquence protéique correspond à la séquence des molécules V β s16 et/ou 17, de préférence V β 16, éventuellement en association avec une ou des molécules naturelles et/ou recombinantes ou un fragment desdites molécules dont la séquence protéique correspond à la séquences des molécules V β s 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22 et préférentiellement des molécules V β s 3 et 12 ou des molécules V β s 7, 14 et 17, et avantageusement 7 et 17 ;

parmi les molécules naturelles, et/ou recombinantes et/ou de synthèse ou un fragment desdites molécules qui codent pour les molécules telles que définies précédemment.

En particulier l'agent thérapeutique et/ou prophylactique est choisi parmi les molécules ADN et/ou ARN ; les oligonucléotides anti-sens et les oligonucléotides anti-gènes ; au moins un ligand susceptible d'interagir avec les V β s 16 et/ou 17, en particulier le V β 16, éventuellement en association avec au moins un ligand susceptible d'interagir avec au moins un des V β s 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22 et préférentiellement les V β s 3 et 12 ; parmi les anticorps, de préférence les anticorps monoclonaux et les anti-récepteurs des TCRs des différents V β s ci-dessus ; au moins un

ligand susceptible d'interagir avec les V β 16 et/ou 17, éventuellement en association avec au moins un ligand susceptible d'interagir avec au moins un des V β s 7, 14 et 17 et 22 et préférentiellement les V β s 7 et 17, en particulier les anticorps, et de préférence les anticorps monoclonaux ou des fragments desdits anticorps et les anti-récepteurs des TCRs des différents V β s ci-dessus ; un agent susceptible de bloquer l'interaction du superantigène aux cellules présentatrices d'antigène ; au moins une cellule modifiée génétiquement *in vitro*, de préférence une cellule d'origine mammifère, par un agent thérapeutique qui consiste en au moins une molécule d'acide nucléique codant pour au moins une molécule dont la séquence protéique correspond à la séquence codant pour les molécules telles que définies précédemment, en particulier une molécule ADN et/ou ARN ; au moins une cellule modifiée génétiquement *in vitro*, de préférence une cellule d'origine mammifère, par un agent thérapeutique qui consiste en au moins une molécule d'acide nucléique codant pour au moins un ligand tel que défini précédemment, en particulier une molécule ADN et/ou ARN ; et leurs utilisations pour la prophylaxie et/ou le traitement d'une pathologie, en particulier une maladie auto-immune, telle que la sclérose en plaques.

Les agents thérapeutiques tels que définis précédemment sont utilisés pour la préparation d'une composition prophylactique et/ou thérapeutique et l'invention porte également sur une telle composition comprenant au moins un desdits agents thérapeutiques en association éventuelle avec un véhicule et/ou un excipient et/ou un adjuvant et/ou un diluant pharmaceutiquement acceptable. Il peut s'agir entre autres de compositions vaccinales à base de protéine(s) ou de peptide(s) ou de séquences d'acides nucléiques dérivés des molécules d'intérêt ou de leurs fragments, comme décrit précédemment pour la prophylaxie et/ou la thérapie d'une maladie auto-immune, en particulier la sclérose en plaques. Ces protéines et peptides administrés sont caractérisés en ce qu'ils ne doivent pas être toxiques pour l'organisme dans lequel ils sont administrés,

ou doivent avoir perdu leur capacité à se fixer à un ligand, et peuvent induire significativement une réponse immune médiée par les lymphocytes T et/ou les anticorps dirigés contre cette protéine. De telles protéines sont dites « modifiées », cependant leur immunogénicité est conservée. De
5 telles molécules immunogéniques modifiées sont obtenues par un nombre de traitements conventionnels, par exemple la dénaturation chimique ou à la chaleur, la troncation ou la mutation avec délétion, insertion ou remplacement d'acides aminés. Un exemple de troncation consiste en la troncation d'acides aminés à l'extrémité carboxy-terminale pouvant aller
10 jusqu'à 5-30 acides aminés. Les molécules modifiées peuvent être obtenues par des techniques synthétiques et/ou recombinantes ou par des traitements chimiques ou physiques des molécules naturelles.

Les molécules d'intérêt naturelles et/ou recombinantes identifiées dans la présente invention et les séquences peptidiques ou les
15 fragments desdites molécules sont utilisées en vaccination prophylactique et thérapeutique contre les maladies, de préférence la sclérose en plaques. Un vaccin comprend une quantité immunogénique effective de la molécule immunogène en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable et éventuellement un adjuvant et/ou un diluant. Les véhicules,
20 adjuvants et diluants pharmaceutiquement acceptables sont bien connus de l'homme du métier. On peut citer à titre de référence le Remington's Pharmaceutical Sciences. L'utilisation de compositions vaccinales est particulièrement avantageuse en association avec un diagnostic précoce de la maladie. La protéine immunogène est utilisée dans la préparation de
25 médicament pour la vaccination prophylactique ou thérapeutique. Les protéines d'intérêt peuvent être éliminées de l'organisme sans induire d'effets secondaires indésirables. L'identification de telles molécules ou peptides vaccins est réalisée comme suit : on vérifie que les molécules candidates modifiées comme décrit précédemment (protéines naturelles,
30 recombinantes, peptides) ne sont pas toxiques pour l'organisme, puis on

vérifie leur immunogénicité (i) en réalisant un test *in vitro* de prolifération de lymphocytes T CD4+ spécifiques de l'antigène administré (T cell assay) ou un test *in vitro* de cytotoxicité des lymphocytes CD8+ spécifiques de l'antigène administré et (ii) en mesurant entre autre le taux d'anticorps circulants dirigés contre la protéine naturelle. Ces formes modifiées sont
5 utilisées pour immuniser des hommes par des procédures standard avec des adjuvants appropriés.

Les vaccins préparés sont injectables, c'est-à-dire en solution liquide ou en suspension. En option, la préparation peut aussi être
10 émulsifiée. La molécule antigénique peut être mélangée avec des excipients qui sont pharmaceutiquement acceptables et compatibles avec l'ingrédient actif. Des exemples d'excipients favorables sont l'eau, une solution saline, le dextrose, le glycérol, l'éthanol ou des équivalents et leurs combinaisons. Si désiré, le vaccin peut contenir des quantités mineures de substances
15 auxiliaires comme des agents " wetting " ou émulsifiants, des agents qui tamponnent le pH ou des adjuvants comme l'hydroxide d'aluminium, le dipeptide muramyl ou leurs variations. Dans le cas des peptides, leur couplage à une plus grosse molécule (KLH, toxine tétanique) augmente quelquefois l'immunogénicité. Les vaccins sont administrés
20 conventionnellement par injection par exemple sous cutanée ou intramusculaire. Des formulations additionnelles favorables avec d'autres modes d'administration incluent des suppositoires et quelquefois des formulations orales.

En général, la concentration en protéine dans la composition
25 utilisée pour une administration *in vivo* est par exemple de 0,1 μ g /ml à 20 mg /ml.

La présente invention concerne également l'utilisation de vaccins incluant des molécules d'acides nucléiques qui codent pour les molécules d'intérêt de l'invention ou des peptides immunogènes ou leur
30 fragment(s), non actifs. Les vaccins d'acides nucléiques, en particulier les

vaccins ADN, sont administrés généralement en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable en injection intramusculaire.

Un autre aspect de l'invention concerne des compositions prophylactiques et/ou thérapeutiques qui comprennent, entre autres, des substances naturelles et/ou synthétiques et/ou recombinantes (i) capables de bloquer et/ou d'inhiber l'activité des molécules d'intérêt de l'invention et/ou de leurs fragments, et/ou (ii) capables d'inhiber leur métabolisme, et/ou (iii) capables de réguler l'expression des molécules d'intérêt de l'invention ou leurs fragments, et/ou (iv) capables d'inhiber la fonction et/ou l'expression des ligands des molécules d'intérêt de l'invention ou leurs fragments. Ces substances peuvent être utilisées dans des traitements prophylactiques et thérapeutiques de la maladie, par exemple la SEP, en administrant des quantités effectives. Les substances peuvent être de petites molécules synthétiques ou naturelles, des dérivés des protéines identifiées dans cette invention, des lipides, des glycolipides, des composés chimiques, etc... Les petites molécules peuvent être criblées et identifiées en grande quantité en utilisant des bibliothèques combinatoires chimiques. L'invention concerne également des compositions pharmaceutiques comprenant ces substances en association avec des véhicules et/ou adjuvants et/ou excipients et/ou diluants physiologiques acceptables, et des méthodes pour la préparation de médicaments à utiliser en thérapie ou en prévention de maladies auto-immunes dont la SEP en utilisant ces substances.

Pour identifier de telles molécules, on utilise les tests et protocoles in vitro et in vivo comme décrit ci-dessus, en utilisant des échantillons prélevés de patient et/ou d'animaux non traités ou traités. Les molécules sélectionnées sont testées à différentes concentrations. Ces inhibiteurs sont aussi testés dans des essais de toxicité et pharmacocinétique pour savoir s'ils peuvent représenter des drogues candidates valables. Les petites molécules peuvent être criblées et

identifiées en grande quantité en utilisant des librairies combinatoires chimiques.

La présente invention concerne aussi l'utilisation de cellules transformées *in vivo* après injection de vecteurs contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique défini à partir des molécules d'intérêt
5 identifiées ou leurs fragments pour la préparation d'une composition prophylactique et/ou thérapeutique dite de thérapie génique et ladite composition.

La composition comprend au moins un vecteur contenant un gène thérapeutique comme décrit ci-dessous, capable d'être introduit dans
10 une cellule cible *in vivo* et d'exprimer le gène d'intérêt thérapeutique *in vivo*. L'avantage repose sur la possibilité de maintenir sur le long terme un niveau basal de molécules exprimées chez le patient traité. Des vecteurs ou acides nucléiques codant pour des gènes d'intérêt thérapeutique sont
15 injectés. Ces vecteurs et acides nucléiques doivent être transportés jusqu'aux cellules cibles et transfecter ces cellules dans lesquelles ils doivent être exprimés *in vivo*.

L'invention concerne l'expression *in vivo* de séquences nucléotidiques et/ou de vecteurs tels que décrit précédemment, c'est-à-dire des séquences correspondant à des gènes d'intérêt thérapeutique
20 codant notamment :

- soit au moins pour une protéine choisie parmi les molécules d'intérêt identifiées dans la présente invention ou leurs fragments, et/ou
- soit au moins pour tout ou partie d'un anticorps polyclonal ou
25 monoclonal capable de se fixer à au moins une protéine choisie parmi les molécules d'intérêt identifiées dans la présente invention et leurs fragments. Il peut s'agir d'anticorps transmembranaire natif, ou de fragment ou dérivé d'un tel anticorps, pour autant que ledit anticorps, fragment ou dérivé d'anticorps soit exprimé à la surface de la cellule cible
30 de mammifère génétiquement modifiée et en ce que ledit anticorps est

capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T " helper " inhiber l'activité d'au moins une molécule d'intérêt de l'invention. Il peut s'agir de fragments d'anticorps exprimés par des cellules capables de sécréter lesdits anticorps dans la circulation sanguine d mammifère ou patient porteur des cellules génétiquement modifiées par le gène codant pour l'anticorps, et/ou

- soit au moins pour une molécule inhibitrice d'au moins une protéine choisie parmi les molécules identifiées dans la présente invention ou leurs fragments, et/ou

soit au moins pour un ligand ou toute partie du ligand capable de se fixer sur au moins une protéine choisie parmi les molécules d'intérêt identifiées dans la présente invention ou leurs fragments, et/ou d'inhiber sa fonction. A partir des séquences en acides aminés des molécules d'intérêt de l'invention ou de leurs fragments , il est à la portée de l'homme de l'art de déduire les séquences nucléotidiques ADN et ARN correspondantes aux molécules d'intérêt ou à leurs fragments en se servant du code génétique et en tenant compte de sa dégénérescence. Ainsi la présente invention concerne l'utilisation de ces séquences nucléotidiques sous forme de séquences anti-sens, de séquences codant pour un gène thérapeutique, de séquences pouvant être contenues dans un vecteur pour la réalisation de transformation cellulaire *ex vitro* et/ou *in vivo* (thérapie génique).

Selon un mode de réalisation particulier, il s'agit d'utiliser la thérapie génique de manière à diriger la réponse immune contre la protéine, le peptide ou la molécule d'intérêt cible, c'est-à-dire contre toute molécule choisie parmi les molécules d'intérêt de l'invention et/ou leurs fragments, et/ou contre toute molécule inhibitrice de l'activité et/ou de l'expression et/ou du métabolisme desdites molécules d'intérêt, et/ou des ligands desdites molécules. Pour cela il est évident que les cellules à cibler pour la transformation avec un vecteur sont des cellules appartenant au système

immun, soit des cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques, macrophages, ...), soit des cellules de type lymphocytes (CD4/CD8).

Selon un mode de réalisation particulier, on modifie génétiquement, notamment *in vivo*, les cellules présentatrices de l'antigène (APC). Les APCs comme les macrophages, les cellules dendritiques, les microgliocytes, les astrocytes jouent un rôle dans l'initiation de la réponse immune. Elles sont les premiers composants cellulaires qui capturent l'antigène, l'apprête dans la cellule et expriment des molécules du CMHI et CMHII transmembranaires impliquées dans la présentation de l'immunogène aux cellules T CD4+ et CD8+, elles produisent des protéines accessoires spécifiques qui participent à l'activation des cellules T via la reconnaissance des déterminants V β du récepteur T à la surface des lymphocytes T (Debrick et al ;, 1991, J. Immunol 147 : 2846 ; Reis et al., 1993, J Ep Med 178 : 509 ; Kovacsovics-bankowski et al., 1993, PNAS 90 : 4942; Kovacsovics-bankowski et al., 1995 Science 267 : 243 ; Svensson et al., 1997, J Immunol 158 : 4229 ; Norbury et al ;, 1997, Eur J Immunol 27 : 280). Pour une vaccination, il peut être avantageux de disposer d'un système de thérapie génique qui peut cibler le transfert de gène dans de telles cellules APC.

On choisit d'exprimer à la surface des cellules APCs *in vivo* tout ou partie d'un anticorps et/ou d'un ligand, capable de réagir avec la protéine ou le peptide cible choisis parmi les molécules d'intérêt de l'invention et/ou leurs fragments. De telles cellules vont alors spécifiquement phagocyter ladite protéine ou ledit peptide, l'apprêter de façon à ce que des fragments de ce peptide soient présentés à la surface des cellules présentatrices de l'antigène.

La littérature propose un grand nombre d'exemples de gènes codant pour des anticorps capables de réagir avec des polypeptides ou récepteurs. Il est à la portée de l'homme de l'art d'obtenir les séquences d'acides nucléiques codant pour de tels anticorps. Citons par exemple les

gènes codant pour les chaînes légères et lourde de l'anticorps YTH 12.5 (anti-CD3) (Routledge et al. 1991, Eur J Immunol 21 : 2717-2725), de l'anti-CD3 selon Arakawa et al ; 1996, J. Biochem. 120 : 657-662. Les séquences d'acide nucléique de tels anticorps sont aisément identifiables à partir des bases de données communément utilisées par l'homme du métier. Il est également possible à partir d'hybridomes disponibles auprès de l'ATCC de cloner les séquences d'acides nucléiques codant pour les chaînes lourdes et/ou légères de ces différents anticorps par les méthodes d'amplification telles que la RT-PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques ou les techniques mettant en œuvre des banques de cDNA (Maniatis et al., 1982, Molecular cloning. A laboratory manual CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Les séquences ainsi clonées sont alors disponibles pour leur clonage dans des vecteurs. Selon un cas préféré de l'invention, la séquence d'acide nucléique codant pour la chaîne lourde de l'anticorps est fusionnée par recombinaison homologue avec une séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide transmembranaire (Polydefkis et al., 1990J Exp Med 171 : 875-887). Ces techniques de biologie moléculaire ont été parfaitement bien décrites.

On choisit d'exprimer à la surface des cellules APCs *in vivo* des fragments immunogènes correspondant à au moins une protéine choisie parmi les molécules d'intérêt de l'invention et/ou leurs fragments. Pour cela, on peut choisir de faire exprimer par le vecteur soit le polypeptide complet soit de manière préférée des polypeptides sélectionnés pour réagir avec des ligands et/ou récepteurs spécifiques. Le peptide immunogène codé par le polynucléotide introduit dans la cellule du vertébré *in vivo* peut être produit et/ou sécrété, apprêté puis présenté à une cellule présentatrice de l'antigène (APC) dans le contexte des molécules du CMH. Les APC ainsi transférées *in vivo* induisent une réponse immune dirigée contre l'immunogène exprimé *in vivo*. Les APC possèdent différents mécanismes pour capturer les antigènes : (a) la capture des antigènes par des

récepteurs membranaires comme les récepteurs aux immunoglobulines (Fc) ou pour le complément disponibles à la surface des granulocytes, des monocytes ou macrophages permettant une délivrance efficace de l'antigène dans les compartiments intracellulaires après phagocytose
5 médiée par les récepteurs. (b) l'entrée dans les APC par pinocytose en phase fluide, impliquant différents mécanismes : la micropinocytose c'est-à-dire la capture de petites vésicules ($0.1\mu\text{m}$) par les puits recouverts de clathrine et la macropinocytose c'est-à-dire la capture de plus grosses vésicules (avec une taille variant entre $0.5\mu\text{m}$ et environ $6\mu\text{m}$) (Sallusto et
10 al. 1995, J Exp Med 182 : 389-400). Tandis que la micropinocytose existe de façon constitutive dans toutes les cellules, la macropinocytose est limitée à des types cellulaires, comme par exemple les macrophages, les cellules dendritiques, les astrocytes, les cellules épithéliales stimulées par des facteurs de croissance (Racoosin et al., J Cell Sci 1992, 102 : 867-
15 880). Dans cette invention, on entend par cellules capables de macropinocytose, les cellules qui peuvent réaliser les événements décrits ci-dessus et les cellules qui peuvent capturer des macromolécules de préférence entre $0.5\mu\text{m}$ et environ $6\mu\text{m}$ dans le cytoplasme.

Selon un mode de réalisation particulier, on modifie
20 génétiquement notamment *in vivo*, les cellules effectrices cytotoxiques ou les lymphocytes T « helper » de façon à ce qu'elles expriment à leur surface des ligands d'au moins une desdites molécules d'intérêt de l'invention, naturellement non exprimés par ces cellules, et capables de se fixer à tout ou partie d'au moins une des molécules d'intérêt de l'invention
25 à la surface de la même cellule ou d'une autre cellule et d'inhiber l'activité d'au moins une molécule d'intérêt de l'invention, par l'introduction dans ces cellules de séquences d'acide nucléique renfermant le gène codant pour un tel polypeptide. Conformément à la présente invention, il est également possible de sélectionner une séquence d'acide nucléique contenant un gène
30 d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie d'un anticorps dirigé

contre une protéine choisie parmi les molécules d'intérêt de l'invention et les séquences peptidiques et/ou les fragments desdites séquences, susceptible d'être exprimé à la surface des cellules cibles du patient à traiter, ledit anticorps étant capable de se fixer à un polypeptide par ces
5 cellules effectdes molécules d'intérêt de l'invention présentes à la surface des lymphocytes cytotoxiques et/ou lymphocytes T " helper ", voire d'inhiber l'activité' de ces molécules d'intérêt.

De nombreux outils ont été développés pour introduire différents gènes hétérologues et/ou vecteurs dans des cellules, en particulier des
10 cellules de mammifères. Ces techniques peuvent être divisées en deux catégories : la première catégorie implique des technique physiques comme la micro-injection, l'électroporation ou le bombardement de particules. La seconde catégorie est basée sur l'utilisation de techniques en biologie moléculaire et cellulaire avec lesquelles le gène est transféré avec un
15 vecteur biologique ou synthétique qui facilite l'introduction du matériel dans la cellule *in vivo*. Aujourd'hui, les vecteurs les plus efficaces sont les vecteurs viraux en particulier les adénoviraux et rétroviraux. Ces virus possèdent des propriétés naturelles pour traverser les membranes plasmiques, éviter la dégradation de leur matériel génétique et introduire
20 leur génome dans le noyau de la cellule. Ces virus ont été largement étudiés et certains sont déjà utilisés expérimentalement dans des applications humaines en vaccination, en immunothérapie, ou pour compenser des déficiences génétiques. Cependant cette approche virale a des limitations notamment due à la capacité de clonage restreinte dans ces
25 génomes viraux, le risque de disséminer les particules virales produites dans l'organisme et l'environnement, le risque de mutagénèse artéfactuelle par insertion dans la cellule hôte, dans le cas des rétrovirus, et la possibilité d'induire une forte réponse immune inflammatoire *in vivo* pendant le traitement, ce qui limite le nombre d'injections possibles (Mc Coy et al.
30 11995, human Gene Therapy 6 : 1553-1560 ; Yang et al., 1996 Immunity

1 : 433-422). D'autres systèmes alternatifs à ces vecteurs viraux existent. L'utilisation de méthodes non virales comme par exemple la co-précipitation avec le phosphate de calcium, l'utilisation de récepteurs qui miment les systèmes viraux (pour un résumé voir Cotten et Wagner 1993, Current
5 Opinion in Biotechnology, 4 : 705-710), ou l'utilisation de polymères comme les polyamidoamines (haensler et Szoka 1993, Bioconjugate Chem 4 : 372-379). D'autres techniques non virales sont basées sur l'utilisation de liposomes dont l'efficacité pour l'introduction de macromolécules biologiques comme l'ADN, l'ARN des protéines ou des substances
10 pharmaceutiques actives a été largement décrite dans la littérature scientifique. Dans ce domaine des équipes ont proposé l'utilisation de lipides cationiques ayant une forte affinité pour les membranes cellulaires et/ou les acides nucléiques. En fait il a été montré qu'une molécule d'acide nucléique elle-même pouvait traverser la membrane plasmique de certaines
15 cellules *in vivo* (WO 90/11092), l'efficacité étant dépendante en particulier de la nature polyanionique de l'acide nucléique. Dès 1989 (Felgner et al., Nature 337 : 387-388) les lipides cationiques ont été proposés pour faciliter l'introduction de larges molécules anioniques, ce qui neutralise les charges négatives de ces molécules et favorise leur introduction dans les
20 cellules. Différentes équipes ont développés de tels lipides cationiques : le DOTMA (Felgner et al., 1987, PNAS 84 : 7413-7417), le DOGS ou TransfectamTM (Behr et al., 1989, PNAS 86 : 6982-6986), le DMRIE et le DORIE (Felgner et al., 1993 methods 5 : 67-75), le DC-CHOL (Gao et Huang 1991, BBRC 179 : 280-285), le DOTAPTM (McLachlan et al., 1995,
25 Gene therapy 2 : 674-622) ou la LipofectamineTM, et les autres molécules décrites dans les brevets WO9116024, WO9514651, WO9405624. D'autre groupes ont développés des polymères cationiques qui facilitent le transfert de macromolécules en particulier des macromolécules anioniques dans les cellules. Le brevet WO95/24221 décrit l'utilisation de polymères
30 dendritiques, le document WO96/02655 décrit l'utilisation du

polyethyleneimine ou polypropyleneimine et les document US-A-5595897 et FR 2719316, l'utilisation des conjugués polylysine.

Etant donné que l'on souhaite obtenir *in vivo* une transformation ciblée vers un type cellulaire donné, il est évident que le vecteur utilisé doit
5 pouvoir être lui-même " ciblé " (comme décrit ci dessus).

Le matériel biologique défini dans la présente invention peut être administré *in vivo* notamment sous forme injectable. On peut également envisager une injection par voie épidermique, intraveineuse, intra-artérielle, intramusculaire, intracérébrale par seringue ou tout autre moyen équivalent.
10 Selon un autre mode de réalisation par administration orale ou tout autre moyen parfaitement connu de l'homme de l'art et applicable à la présente invention. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée, une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage les mieux appropriés varient en fonction de différents
15 paramètres tels que par exemple l'individu ou la maladie à traiter, du stade et/ou de l'évolution de la maladie, ou encore de l'acide nucléique et/ou de la protéine et/ou peptide et/ou molécule et/ou cellule à transférer ou de l'organe/tissus cible.

20 Définitions :

Par fragment d'anticorps on entend les fragments F(ab)₂, Fab', Fab, sFv (Blazar et al., 1997, Journal of Immunology 159 : 5821-5833 ; Bird et al., 1988 Science 242 : 423-426) d'un anticorps natif, et par dérivé on entend, par exemple, un dérivé chimérique d'un tel anticorps (voir par
25 exemple les chimères des anticorps antiCD3 Souris/Homme dans Arakawa et al., 1996 J Biochem 120 : 657-662 ou les immunotoxines telles que sFv-toxine de Chaudary et al 1989, Nature 339 : 394-397).

Par anticorps transmembranaire on entend un anticorps dont au moins la région fonctionnelle capable de reconnaître et de se fixer à son
30 antigène spécifique est exprimée à la surface des cellules cibles pour

permettre lesdites reconnaissance et fixation. Plus particulièrement, les anticorps selon la présente invention consistent en des polypeptides de fusion comprenant les amino acides définissant ladite région fonctionnelle et une séquence d'acides aminés (polypeptide transmembranaire) permettant l'ancrage au sein de la double couche lipidique membranaire de la cellule cible ou à la surface externe de cette bi-couche. Les séquences nucléiques codant pour de nombreux polypeptides transmembranaires sont décrites dans la littérature. Selon un cas tout à fait avantageux, la séquence d'acide nucléique codant pour la chaîne lourde de l'anticorps est fusionnée avec la séquence d'acide nucléique codant pour un dit polypeptide transmembranaire.

Par éléments assurant l'expression d'un gène *in vivo*, on fait notamment référence aux éléments nécessaires pour assurer l'expression dudit gène après son transfert dans une cellule cible. Il s'agit notamment des séquences promotrices et/ou des séquences de régulation efficaces dans ladite cellule, et éventuellement les séquences requises pour permettre l'expression à la surface des cellules cibles dudit polypeptide. Le promoteur utilisé peut être un promoteur viral, ubiquitaire ou spécifique de tissu ou encore un promoteur synthétique. A titre d'exemple, on mentionnera les promoteurs tels que les promoteurs des virus RSV (Rous Sarcoma Virus), MPSV, SV40 (Simian Virus), CMV (Cytomegalovirus) ou du virus de la vaccine, les promoteurs du gène codant pour la créatine kinase musculaire, pour l'actine. Il est en outre possible de choisir une séquence promotrice spécifique d'un type cellulaire donné, ou activable dans des conditions définies. La littérature procure un grand nombre d'informations relatives à de telles séquences promotrices.

Par cellules effectrices cytotoxiques, on entend les macrophages, les astrocytes, les lymphocytes T cytotoxiques (TCL) qui expriment à leur surface les molécules CD8, et les cellules tueuses (NK) ainsi que leurs dérivés telles que par exemple les LAK (Versteeg 1992

Immunology today 13 : 244-247 ;Brittende et al 1996, Cancer 77 :1226-1243). Par 'lymphocytes T helper' on entend désigner notamment les cellules exprimant à leur surface les molécules CD4 qui permettent après activation la sécrétion de facteurs d'activation des cellules effectrices de la réponse immune. Les polypeptides et notamment les récepteurs exprimés à la surface de ces cellules et qui sont impliqués dans l'activation de telles cellules consistent notamment en tout ou partie du complexe TCR comprenant les déterminants Vb et/ou le CD3, tout ou partie des complexes CD8, CD4, CD28, LFA-1, 4-1BB (Melero et al., 1998, Eur J Immunol 28 : 1116-1121), CD47, CD2, CD1, CD9, CD45, CD30, CD40, tout ou partie des récepteurs de cytokines (Finke et al., 1998, Gene therapy 5 : 31-39), telles que IL-7, IL-4, IL-2, IL-15 ou GM-CSF, tout ou partie du complexe récepteur des cellules NK tel que par exemple NKAR, Nkp46, .. ; (Kawano et al., 1998 Immunology 95 :5690-5693 ; Pessino et al., 1998 J Exp Med 188 :953-960), Nkp44, tout ou partie des récepteurs de macrophages tels que par exemple le récepteur Fc (Deo et al., 1997, Immunology Today 18 : 127-135).

Par efficacité thérapeutique de manière générale, on entend l'effet inhibiteur de l'activité de type superantigénique telle que définie par les profils V β s de l'invention et la capacité d'inhiber et/ou de bloquer les interactions moléculaires et/ou immunologiques des V β s de l'invention conduisant à leur expansion ou diminution telle que décrite précédemment.

Par surnageant ou fraction de surnageant on entend le surnageant ou une fraction de ce dernier jusqu'aux molécules, peptides et/ou protéines qu'ils comprennent.

Les expériences ont été réalisées à partir :

- de cellules mononucléées sanguines provenant de onze donneurs sains et purifiées sur un gradient de Ficoll. Le typage HLA DR de chaque donneur a été effectué au préalable.

- (i) d'un pool de surnageants de culture concentré par ultracentrifugation (100 000g x 2 heures) de lymphocytes B humains provenant de patients SEP (LBSEP) ou de témoins non-SEP (LBTE), et (ii) de surnageant de culture de cellules de plexus choroïdes humains provenant d'un patient SEP (GRE) et d'un témoin non-SEP (LES).

Exemple 1 : Préparation d'extraits de surnageants de culture de cellules provenant de patients atteints de SEP ou de témoins non SEP.

Les protocoles de culture des cellules de plexus choroïdes ont été décrits dans la demande de brevet PCT WO 93/20188.

1) Culture des cellules de plexus choroïdes.

Les cellules de plexus choroïdes sont obtenues à partir d'explants prélevés post-mortem et mis en culture, éventuellement après dissociation mécanique et/ou enzymatique des tissus prélevés. Les cellules qui prolifèrent dans la culture sont d'allure fibroblastique et correspondent à des cellules d'origine leptoméningées, parfois appelées "fibroblastes de plexus choroïdes". Elles peuvent être cultivées pendant un certain nombre de passages et être congelées lors de passages intermédiaires et décongelées ultérieurement pour une nouvelle culture.

Les cellules LES (témoin non-SEP) et GRE (SEP) ont été décongelées puis remises en culture dans du milieu F-12 "complet" contenant :

pénicilline 200 U/ml

streptomycine 20 mg/l

L-glutamine 6 mM

pyruvate de sodium 1 %

acides aminés essentiels 1%.

anticorps anti-IFN leucocytaire (anti-interféron alpha polyclonal commercialisé par Sigma) ajouté à 10 U/ml final.

Ce milieu est supplémenté de 30% de SVF (sérum de veau foetal) décomplémenté à 56°C pendant 30 min. La culture cellulaire se fait dans une étuve à 37°C humidifiée, en présence de 5% de CO₂. Le changement du milieu s'effectue deux fois par semaine. Si les cellules
5 adhérentes sont à confluence dans le fond du flacon, la culture est dédoublée. Pour ce faire, le surnageant de culture (SC) est éliminé et remplacé par du milieu F12 complet-SVF 30% "frais". A l'aide d'un grattoir, ou d'un mélange trypsine-EDTA, les cellules sont décollées de la paroi du flacon. Puis, elles sont resuspendues soigneusement avant d'être
10 partagées dans deux flacons de culture. On dit que la culture est dédoublée ou qu'elle a subi un passage.

Les SC sont recueillis et congelés à -80°C pour l'ultracentrifugation, après élimination des débris cellulaires par centrifugation à 3000 tours/min pendant 30 min. Pour l'étude, un volume
15 total de 400 ml environ a été décongelé, regroupé et homogénéisé avant ultracentrifugation, pour chaque culture (SEP/GRE et NON-SEP/LES).

2) Culture des lignées B lymphoblastoïdes.

- Obtention de lymphocytes B à partir du sang périphérique et établissement de lignées B lymphoblastoïdes immortalisées par l'EBV (Virus
20 d'Epstein Barr).

Les lymphocytes humains sont isolés à partir de 50 ml de sang hépariné dilué au demi avec du RPMI 1640 par centrifugation sur un gradient de Ficoll. Ils sont délicatement recueillis de l'anneau ainsi que des éventuels agrégats cellulaires pouvant flotter juste au dessous de l'anneau.
25 Les cellules sont alors lavées deux fois dans du milieu RPMI 1640. Après ces lavages, les cellules sont resuspendues à la concentration de 2x10⁶ cellules/ml dans du milieu RPMI 1640 contenant :

pénicilline 200 U/ml
streptomycine 20 mg/l
L-glutamine 6 mM

pyruvate de sodium 1 %

acides aminés essentiels 1 %.

anticorps anti-IFN leucocytaire (anti-interféron alpha polyclonal-Sigma) ajouté à 10 U/ml final.

5 Ce milieu est supplémenté de 20% de SVF (sérum de veau foetal) décomplémenté à 56°C pendant 30 min.

Les flacons de culture sont incubés dans des étuves à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂ après avoir ajouté au milieu de culture, 1 ml de surnageant filtré de culture productive EBV B95-8 (soit 10⁵ particules virales EBV pour 4 à 5x10⁶ lymphocytes totaux) en présence de 200 µl d'une solution de CSA-Sandoz (2 µg de CSA pour 4 à 5x10⁶ lymphocytes totaux) et ceci, jusqu'au premier changement de milieu de culture. Le changement du milieu de culture s'effectue deux fois par semaine. Les flacons sont entretenus pendant trois mois, au delà
10 desquels, si aucune prolifération lymphocytaire n'a débuté, le flacon est jeté. Lorsque la prolifération cellulaire a commencé dans un flacon, les cellules sont conservées dans le même flacon jusqu'à ce qu'un nombre
15 significatif de colonies prolifératives forment des amas. Le "dédoublément" de la culture (passage ou repiquage) s'effectue après dissociation
20 mécanique des amas par pipetage et refoulement vigoureux. Les cultures ainsi obtenues correspondent à des lignées de lymphocytes B (lignées Lymphoblastoïdes). Quatre lignées provenant de SEP certaines et deux lignées provenant de témoins non-SEP ont été obtenues dans ces conditions.

25 - Congélation des cellules.

Les cellules sont lavées dans du milieu RPMI-SVF 20%. Le culot repris dans du SVF (1 ml environ pour 8x10⁶ cellules) est transféré dans un cryotube pour la congélation. 200 µl d'une solution de SVF DMSO préparée à l'avance et conservée à -20°C sont ajoutés à la suspension cellulaire
30 (concentration finale de DMSO = 10%) qui est alors légèrement vortexée.

Les cellules sont ainsi congelées à -80°C dans du coton cardé, puis stockées le lendemain dans l'azote.

- Décongélation et remise en culture des cellules congelées dans du DMSO.

5 Les cellules décongelées à température ambiante sont lavées deux fois dans 10 ml de milieu RPMI-SVF 20% avant la remise en culture.

Les quatre cultures SEP et les deux cultures témoins sont remises en culture en même temps, avec les mêmes réactifs et les mêmes lots de milieux, mais cultivées dans des laboratoires de culture séparés (P3 et P2 respectivement). Les cultures individuelles ont été menées en parallèle pendant environ un mois, afin de recueillir un volume, après pool des SC séparés de chaque patient SEP et de chaque témoin, d'environ 600-800 ml de chaque type (LBSEP et LBTE). Ce volume a été réuni par congélation systématique à -80°C des surnageants prélevés deux fois par
10 semaine après une pré-centrifugation à 1800 tours/min pendant 10 min.
15 pour sédimenter et récupérer les cellules en suspension, suivie d'une deuxième pré-centrifugation à 3000 tours/min pendant 30 min. pour éliminer les débris cellulaires.

Les surnageants SEP et non-SEP ont été décongelés et regroupés séparément et mélangés (SEP = pool LBSEP et témoin = pool LBTE) avant ultracentrifugation (pools de 650 ml). Les culots d'ultracentrifugation d'un même pool centrifugé après répartition dans des tubes séparés de 40 ml, ont aussi été regroupés et mélangés avant aliquotage et congélation de l'extrait à tester, afin d'obtenir un extrait
20 homogène sur tous les aliquotes d'une même origine.
25

3) Détection des mycoplasmes pouvant contaminer la culture.

Un kit (Boehringer) basé sur la technique ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) a été utilisé pour la détection de mycoplasmes afin de garantir l'absence de contamination mycoplasmaïque dans les cultures.

4) Obtention d'un concentrat de surnageant de culture par ultracentrifugation sur coussin de glycérol.

Les surnageants décongelés et préalablement débarrassés des débris cellulaires sont transférés dans des tubes pour ultracentrifugation.

5 Un coussin de glycérol (PBS - glycérol 30%) de quelques cm est alors déposé dans le fond du tube. Après deux heures d'ultracentrifugation à 100 000 x g (calculé au milieu du tube) à 4°C et décélération lente (30 min.), le surnageant est éliminé, le culot repris dans du tampon PBS avec 10% de glycérol, regroupé et homogénéisé avec les culots des autres tubes du même pool d'origine et le tout est aliquoté sous 100 µl. Un aliquot sert pour le dosage d'activité transcriptase inverse (RT) et les autres sont conservés à -80°C. Les aliquots nécessaires sont décongelés pour les tests sur cellules mononucléées sanguines.

15 **Exemple 2 : Préparation de cellules mononucléées sanguines provenant de onze donneurs sains dont le typage HLA DR a été établi.**

Donneurs Typage HLA DR

1-	DR2-DR4
2-	DR1-DR1 → DR1
20 3-	DR3-DR11 (5)
4-	DR13-DR8
5-	DR13(6)-DR14 → DR6
6-	DR2-DR2 → DR2
7-	DR3-DR12(5)
25 8-	DR3-DR7
9-	DR3-DR13
10-	DR4-DR5
11-	DR4-DR4 → DR4

30 Les cellules mononucléées sanguines de 100 ml de sang, provenant des onze donneurs précités, sont séparées des hématies sur

gradient de Ficoll (15 ml de Ficoll/25 ml de sang) par centrifugation 15 min. à 800 g. Les cellules sont ensuite lavées avec du milieu RPMI 1640 et recentrifugées dans les mêmes conditions avant d'être aliquotées et congelées dans l'azote gazeux à la concentration finale de 2×10^7 cellules/ml dans une solution de 90% de sérum humain décomplémenté et 10% de DMSO

Exemple 3 : Mise en culture de cellules mononucléées sanguines de donneurs sains.

Après décongélation rapide, les lymphocytes de donneurs sains (5×10^6 cellules) sont mis en contact 30 min. à 37°C avec 100 μ l de surnageants de culture concentrés (i) de LBSEP ou de LBTE ou (ii) de GRE ou de LES.

Après mise en contact, les cellules sont resuspendues dans du milieu de culture (RPMI supplémenté de 10% de sérum humain AB décomplémenté et de gentamycine) et distribuées dans des cupules de plaques de culture à 24 puits à raison de 2×10^6 cellules par ml. La viabilité des cellules et leur immunocompétence ont été vérifiées en introduisant en contrôle une activation par un mitogène classique (PHA à 5 μ g / 2×10^6 cellules).

Exemple 4 : Analyse du répertoire V β des lymphocytes CD3 par immuno-détection.

L'analyse du répertoire des CD3 a été réalisée en utilisant un anticorps anti-CD3 couplé à de l'isothiocyanate de fluorescéine et 12 anticorps anti-V β couplés à la biotine (Immunotech-Coulter-Beckman). Ces douze anticorps sont répertoriés dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1

Ac anti-V β	Référence	Cible Sag	Commentaires
V β 2	IM 2081	TSST-1	10% de CD3 + PBL
V β 3	IM 2109	SEB	
V β 5-1	IM 2082		4-7% de CD3 + PBL
V β 7	IM 2288		1.5-2.4 % de CD3 + PBL Superantigène diabète IDDM (Conrad et al., J Immunol, 1997)
V β 8	IM 1191	SEE, N protéine rage	2.6-5.1% de CD3 + PBL Superantigène rage (Lafon et al., Nature 1992)
V β 12	IM 2019	SEB (12a)	1.1-1.9% de CD3 + PBL
V β 13-1	IM 2021	EBV	1.8-3.3% de CD3 + PBL Superantigène Epstein Barr (Sutkowski et al., J. Exp. Med. 1996)

Vβ14	IM 2022		2.2-5.6% de CD3 + PBL
Vβ16	IM 2023		1.1- 2 % de CD3 + PBL
Vβ17	IM 1194	MAM, SEB	3.3-7% de CD3 + PBL
Vβ21-3	IM 2025		2.2-3.6 % de CD3 + PBL
Vβ22	IM 2026		2.4-5.1 % de CD3 + PBL

Après 24 heures de culture, le contenu des cupules a été cultivé respectivement en présence de LBSEP, LBTE et PHA, ou GRE, LES, et PHA est récolté. Le surnageant est aliquoté et conservé à -80°C pour la

5 détection ultérieure de cytokines. Les cellules sont lavées dans du tampon phosphate, réparties dans des microtubes et incubées avec un anticorps anti-CD3 marqué à l'isothiocyanate de fluoréscéine ($0,5\ \mu\text{g}$ pour 5×10^5 cellules) et avec chaque anticorps anti-Vβ biotinylé ($1\ \mu\text{g}$ d'anticorps pour 2×10^6 cellules), pendant 30 min à 4°C simultanément. Les cellules sont

10 ensuite lavées dans du tampon phosphate et incubées 30 min à 4°C avec de la streptavidine couplée à la phycoérythrine ($1\ \mu\text{l}$ dans $50\ \mu\text{l}$ de suspension cellulaire). A l'issue de ce temps d'incubation, les cellules sont lavées et resuspendues dans $250\ \mu\text{l}$ de Cell Fix (nom commercial) avant d'être analysées en cytofluorimétrie. L'immuno-fluorescence est mesurée à

15 l'aide d'un cytofluorimètre FACSCALIBUR (nom commercial) équipé du logiciel CellQUEST II (nom commercial) (Becton-Dickinson).

Pour chaque culture et chaque anticorps, les pourcentages de cellules exprimant un V β particulier parmi les cellules CD3+ totales sont calculés. La taille des familles est comparée dans les cultures activées par LBSEP, LBTE, LES et GRE). Une augmentation de 31% d'une famille V β dans une culture LBSEP ou GRE par rapport aux témoins négatifs est
 5 considérée comme une augmentation significative.

Exemple 5 : Protocole d'analyse du répertoire V β des lymphocytes T par biologie moléculaire.

10 Des extraits de surnageant de culture de cellules provenant de patients atteints de SEP ou de témoins non SEP sont préparés comme décrit dans l'exemple 1, et des cellules PBL de donneurs sains sont préparées comme décrit dans l'exemple 2. Les deux préparations sont mises en culture comme décrit dans l'exemple 3 et les cellules T sont
 15 récupérées avec les PBL de la culture. L'analyse du répertoire V β du récepteur T présent à la surface de ces cellules est réalisé par biologie moléculaire comme décrit ci-dessous :

Les ARN totaux des cellules lymphoïdes récupérées sont extraits en utilisant des techniques conventionnelles d'extraction, bien connues de l'homme de l'art. Une transcription inverse est réalisée; des ADN
 20 complémentaires sont ainsi synthétisés (par exemple en utilisant le kit RT-Expand, Roche). Puis on réalise une amplification spécifique d'une famille de transcrits V β (TCRBV) en choisissant des primers spécifiques de la famille Vb étudiée (par exemple en choisissant des primers décrits dans la
 25 littérature). (Lue C et al., Am J Clin Pathol 1999 111 : 683 ; Akatsuka Y et al., Tissue Antigens 1999 53 : 122 ; Ryan DK et al., Mol Pathol 1997 50 : 77 ; Lang R et al., J Immunol Methods 1997, 203 : 181 ; Dreitz MJ et al., Vet Immunol Immunopathol 1999 69 : 113 ; Mima T et al., Biochem Biophys Res Commun 1999 263 : 172 ; Aifantis I et al., Immunity 1998
 30 9 : 649 ; Deng X et al., J Biol Chem 1998 273 : 23709 ; Lobashevsky A

et al., Transplantation 1996 62 : 1332 ; Hawke NA et al., J Immunol 1996 156 : 2458 ; Lim SH et al., Cancer Immunol Immunother 1996 42 : 69). Des réactions d'extension des amplicons sont ensuite réalisées en utilisant d'une part des oligonucléotides TCR-BC fluorescents, et d'autre
 5 part des oligonucléotides TCR-BJ fluorescents (13 J beta). Ces produits d'amplicons marqués à la fluorescence présentent des tailles différentes du fait des réarrangements des gènes spécifiques de chaque clone T V β « x » et sont analysés sur gel d'électrophorèse, et la fluorescence associée à chaque bande sur le gel est lue et quantifiée à l'aide d'un PhosphorImager.

10 Ainsi on obtient des graphes dont le profil traduit l'amplification d'une famille de V β présente à la surface des cellules T (figure 3). Lorsque l'activation de la cellule T est de type polyclonal, plusieurs pics sont observés sur un même graphe, traduisant la présence de nombreuses molécules de la famille V β à la surface des cellules T.

15 **Exemple 6 : Détection des cytokines produites.**

Les cytokines inflammatoires (IL-6, TNF- α et INF- γ) ont été mesurées à l'aide de kits ELISA d'immunocapture Optalia (nom commercial) de chez Pharmingen-Becton-Dickinson, sur plaques de titration de 96 puits
 20 selon les recommandations du fabricant. Une référence constituée d'une gamme de dilutions de cytokine recombinante de concentration connue (en pg/ml) est incluse sur chaque plaque d'essai. La densité optique est mesurée au spectrophotomètre à la longueur d'onde 405 nm pour la lecture du chromogène ABTS (Boehringer Mannheim). La recherche des cytokines
 25 est effectuée dans 50 μ l de surnageants de culture 24 heures après la mise en contact pour 8 donneurs stimulés avec LBSEP ou LBTE et dans les surnageants de cultures 24 heures et 72 heures après la mise en contact pour 6 donneurs stimulés avec LES ou GRE.

Les résultats sont exprimés en pg/ml de surnageant, correspondant à la production de 2×10^6 cellules.

Tableau 2

	LBSEP	LBTE
IL-6 (n = 6)	714	220
INF- γ (n = 3)	716	383
TNF- α (n = 6)	83	54

Exemple 7 : Estimation du pourcentage de cellules en apoptose.

Le pourcentage de lymphocytes entrés en apoptose a été mesuré dans les populations de PBL mises en culture pendant 24 heures avec LBSEP ou LBTE- pour 8 donneurs, d'une part, et dans les populations mises en culture avec LES et GRE pour 9 donneurs d'autre part.

L'apoptose a été estimée au cytofluorimètre en prenant en compte les caractéristiques de taille et de granulométrie existant entre les cellules vivantes et les cellules en apoptose, comme décrit pour les lymphocytes Jurkat (Thoulouze *et al* J. Virol.71, 7372-7380, 1997).

Le pourcentage d'apoptose dans les cultures de lymphocytes stimulés avec LBSEP est significativement supérieur à celui obtenu dans les cultures de lymphocytes stimulés par LBTE. (moyenne du pourcentage d'apoptose de 38,35 pour LBSEP contre 28% pour LBTE).

Exemple 8 : Détection d'antigènes viraux dans les cultures de lymphocytes.

Deux mélanges d'anticorps ont été utilisés pour détecter la présence d'antigènes viraux dans les lymphocytes humains cultivés en présence d'extraits de SC de plexus choroïdes LES et GRE dans les mêmes

conditions que pour l'analyse de l'expansion des familles TCR (récepteur des cellules T) $V\beta$ a été réalisée.

On a réalisé (i) un premier pool (pool 1) d'anticorps polyclonaux, obtenus chez le lapin avec 1 μ l de chacun des trois anticorps polyclonaux, et (ii) un deuxième pool (pool 2) d'anticorps monoclonaux obtenus après
5 immunisation de souris avec 1 μ l de chacun des trois anticorps monoclonaux,. Ces anticorps polyclonaux et monoclonaux sont dirigés contre les protéines codées par les séquences *env*, *gag* et *pol* de MSRV-1 décrites dans les demandes de brevet WO-A-98/23755 et WO-A-
10 99/02666.

Des lymphocytes humains provenant de donneurs sains (10^6 cellules par coloration) sont mis en contact 24 heures avec des surnageants ultracentrifugés de cellules de plexus choroïdes LES ou GRE. Les lymphocytes sont ensuite lavés dans du milieu RPMI. Le culot cellulaire
15 est repris dans 500 μ l de tampon de fixation (tampon phosphate 3% de paraformaldéhyde) et incubé pendant 20 min. à 4°C. Après deux lavages dans un tampon de perméabilisation (tampon phosphate contenant 1% de sérum de veau fœtal, 0,1% d'azide de sodium, 0,1% de saponine), les cellules fixées sont incubées pendant 30 min. à 4°C avec 3 μ l de chacun
20 des pools anti-MSRV-1, dans un volume final de 50 μ l de tampon de perméabilisation. Après un lavage dans du tampon de perméabilisation, les cellules incubées avec les anticorps anti-MSRV-1 du pool 1 sont incubées 30 min. à 4°C avec des anticorps biotinylés dirigés contre les immunoglobulines de lapin (Byosis, dilution 1/2000), lavées, puis incubées
25 30 min. à 4°C avec de la strepavidine couplée à de l'isothiocyanate de fluoréscéine (Strep-FITC 1/50^e, Immunotech Coulter-Beckman). Les cellules incubées avec les anticorps anti-MSRV-1 du pool 2 sont incubées avec des anticorps couplés à la biotine dirigés contre les anticorps de souris (Amersham, 1/500), puis, après lavage, avec de la Strep-FITC. Les cellules

resuspendues dans 250 μ l de Cell-fix sont ensuite analysées par cytofluorimétrie.

Exemple 9 : Analyse des répertoires V β des lymphocytes CD3.

5 L'analyse des répertoires des huit donneurs est réalisée par double marquage sur des cellules mises en contact 24 heures, soit avec LBSEP, soit avec LBTE. Ces mêmes donneurs ont été testés en présence de LES et GRE.

10 Le pourcentage de cellules exprimant un V β particulier parmi les lymphocytes CD3 dans les cultures de lymphocytes stimulées par LBSEP est comparé à celui obtenu dans les cultures stimulées par LBTE. Les répertoires V β utilisés par deux donneurs (donneur 1 et donneur 5) en réaction à LBSEP (histogrammes sombres) et à LBTE (histogrammes clairs) sont présentés sur les Figures 1 (donneur 1) et 2 (donneur 5). Pour le
15 donneur 1, les pourcentages de V β utilisés pour répondre à LBSEP sont identiques à ceux utilisés pour répondre à LBTE, à l'exception de V β 7. En revanche, pour le donneur 5, le pourcentage de V β 3 et de V β 16 recrutés par LBSEP est différent de ceux recrutés par LBTE (respectivement 8.2 et 13.6 pour V β 3 et 2.1 et 4.2 pour V β 16).

20 Une augmentation de 31% d'une famille V β par rapport au pourcentage obtenu dans les cultures de lymphocytes LBTE est considérée comme la marque d'une expansion significative d'une famille de V β particulier par LBSEP.

25 L'analyse comparative utilisant ce critère est présenté dans le tableau 3 ci dessous.

Tableau 3

N°	HLA	Vβ2	Vβ3	Vβ5	Vβ7	Vβ8	Vβ12	Vβ13	Vβ14	Vβ16	Vβ17	Vβ21	Vβ22
1	DR 2/4				X								
4	DR 13/8						X			X			
5	DR 13/14		X							X			
7	DR 3/12										X		
8	DR 3/7		X							X			
9	DR 3/13					X				X			
10	DR 4/5		X				X		X	X			X
11	DR 4/4	X					X			X			
	% age	12,5	37,5	0	13	13	37,5	0	12,6	75	12,5	0	12,5

Après un contact avec les LBSEP, on observe que :

75 % (6/8) des donneurs présentent une expansion de la famille

Vβ 16,

37,5 % (3/8) des donneurs présentent une expansion de la famille Vβ 12,

37,5 % (3/8) des donneurs présentent une expansion de la famille Vβ 3, et

12,5 % (1/8) des donneurs présentent une expansion de l'une des familles Vβ 2, 7, 8, 14, 17 ou 22.

Les résultats obtenus avec les préparations LES et GRE peuvent être illustrés par l'analyse des répertoires obtenus avec les donneurs 10 et 11. GRE induit l'expansion de Vβ 16. Les expansions obtenues avec GRE sont du même ordre et de même nature que celles obtenues avec LBSEP.

L'expansion V β 16 n'est pas liée à la présence d'un DR particulier, puisqu'elle peut être obtenue aussi bien dans un environnement DR3 que DR4, DR5, DR8, DR13 ou DR14, c'est à dire avec 6 des 8 haplotypes exprimés par les 6 donneurs.

LBSEP n'induit généralement chez les donneurs l'expansion majoritaire que d'une ou deux familles V β , sauf dans deux cas : un donneur présente à la fois une expansion des V β 3,12,14,16 et 22, un autre à la fois de V β 12 et V β 16. Les haplotypes de ces deux donneurs sont DR4/4 et DR4/5 respectivement.

Exemple 10 : Analyse du répertoire V β des lymphocytes T par biologie moléculaire.

L'expérimentation est réalisée comme décrite dans l'exemple 5. Des cellules PBL de donneurs sains différents (donneur 7, 14, 19 et 18) sont récupérées et mises en contact avec des culots centrifugés de surnageants de cellules B issues de patients SEP ou d'individus sains. Des amplification du déterminant V β 16 ou V β 17 sont réalisées (voir figures 4A et 4B).

Amplification du déterminant V β 16

- A : Donneur sain 7 et cellules B de témoin sains
- B : Donneur sain 7 et cellules B de patients SEP
- C : Donneur sain 14 et cellules B de patients SEP
- D : Donneur sain 14 et milieu de culture
- E : Donneur sain 19 et cellules B de patients SEP
- F : Donneur sain 19 et cellules d'individu sain
- G : Donneur sain 19 et milieu de culture
- H : Donneur sain 18 et cellules B de patient SEP
- I : Donneur sain 18 et cellules d'individu sain
- J : Donneur sain 18 et cellules d'individu sain

Amplification du déterminant V β 17

A : Donneur sain 17 et cellules B de patient SEP

B : Donneur sain 17 et cellules B d'individu sain

C : Donneur sain 17 et milieu de culture

5 Les graphes nous montrent que nous avons un profil différent de la même famille de V β 16, voire V β 17 amplifiée après incubation avec les cellules B de patients SEP ou avec les cellules B d'individu sain, pour un même donneur sain de PBL. Ces profils sont polyclonaux. Cela traduit bien l'activation polyclonale des cellules du donneur sain après une incubation
10 avec des culots concentrés de surnageants de cellules B de patients SEP, différente de celle avec des culots concentrés de surnageants de cellules B d'individu sain. Cette activation polyclonale traduit la présence d'un ou plusieurs superantigène(s) ou superantigène-like dans les culots concentrés de SEP. Cette analyse par biologie moléculaire de l'expansion des cellules T
15 de déterminant Vb16 suite à l'incubation en présence de culots concentrés de SEP confirme l'observation réalisée après analyse par immuno-détection en détectant directement les déterminants V β s membranaires par des anticorps spécifiques, comme décrit dans l'exemple 9.

20

Exemple 11 : Mise en évidence de l'expansion ou de la perte des lymphocytes porteurs de V β associée à la SEP.

Des suspensions de PBL 'Peripheral Blood Lymphocytes' prélevés à partir de donneurs sains (donneurs 5, 7, 14, 15, 19) sont mis en
25 contact avec des culots concentrés de surnageants de lignées cellulaire B (ACX, FEX, BUX) établies à partir de prélèvements sanguins de patients SEP, comme décrit dans l'exemple 3. En parallèle ces suspensions sont mises en contact avec des culots concentrés de surnageants de lignées cellulaires B (T8, T9) établies à partir de prélèvements sanguins de patients
30 sains. Après incubation, le répertoire V β des cellules CD3 est analysé par

immuno-détection comme décrit dans l'exemple 4. Une prolifération majeure des cellules T présentant le déterminant V β 16 est observée, ainsi qu'une prolifération de cellules T avec V β 7, 14, 17 (tableau 4); ainsi comme décrit précédemment, une activité superantigénique est mise en

5 évidence induite par les culots concentrés de surnageants de lignées B issues de patients SEP. Les pourcentages de prolifération des cellules T *in vitro* est estimé comme décrit précédemment. Parallèlement, il est clairement montré dans cet exemple, qu'il peut y avoir également, avec des

10 donneurs sains différents, une diminution des sous populations de cellules T portant ces mêmes V β s 16, 7, 14, 17 pour d'autres donneurs. Cette diminution peut refléter une mise en anergie ou en apoptose des cellules suite à l'effet superantigénique induit par les culots concentrés de surnageants cellulaires issus de patients SEP. Il est à noter que 100% des

15 suspensions PBL saines testées répondent soit par une expansion cellulaire soit par une diminution du nombre de cellules T présentant le déterminant V β 16, suite à une incubation avec les culots concentrés de surnageants de cellules B issues de patients SEP, et possédant une activité superantigénique.

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous

20

Tableau 4

Donneur	HLA DR	V β 2	V β 7	V β 14	V β 16	V β 17
5	13/14	+ 7,6	- 38	- 28	- 49	- 31
7	3/12	- 6	- 21	+ 37	+ 315	- 24
14	4/14				+ 37	+ 5,13
15	3/13	+ 11	- 24	+ 65	- 72	- 2
19	4/15				+ 56	

Exemple 12 : Stimulation de la production de cytokines.

Les cultures de lymphocytes stimulés par LBSEP se distinguent par des productions significativement supérieures d'IL-6 et d'INF- γ comparées à celles stimulées par LBTE. Les titres de TNF- α sont très faibles en revanche et équivalents pour les deux types de cultures. Les résultats, exprimés en pg/ml de culture correspondant à 2×10^6 cellules. Ces résultats sont présentés dans le tableau 5.

10

Tableau 5

	LBSEP	LBTE
IL-6 (n = 6)	714	220
INF- γ (n = 3)	716	383
TNF- α (n = 6)	83	54

Exemple 13 : Détection d'antigènes viraux dans les cultures de lymphocytes.

15

La présence d'antigènes rétroviraux spécifiques a été recherchée à l'aide des deux pools d'anticorps dirigés contre des protéines de MSRV-1. Les résultats d'immunofluorescence sur les cultures inoculées avec du SC ultracentrifugé de LES ou GRE, obtenus avec les deux pools (pool 2 = monoclonaux de souris, pool 1 = polyclonaux de lapin) sont présentés dans la table 4 pour les donneurs 10 et 11. Les chiffres représentent les pourcentages de cellules présentant des intensités de fluorescence comprises entre les canaux 100 et 1000.

20

Tableau 6

	Donneur 10		Donneur 11	
	LES	GRE	LES	GRE
Pool 1	0.6	22.6	0.4	4.76
Pool 2	7.11	30.77	0.12	4.69

5 Les résultats sont présentés comme des pourcentages de population exprimant une intensité de fluorescence comprise entre les canaux 100 et 1000.

L'expansion, parallèle à ces résultats concernant les antigènes MSRV-1, d'un nombre restreint de familles V β chez une majorité de
10 donneurs en l'absence de restriction HLA indique que la réponse s'apparente à une réponse de type superantigène. La production de cytokines de type inflammatoire (IL-6, IFN- γ) conforte l'existence d'un environnement favorable au recrutement lymphocytaire.

L'absence de production de TNF- α est un argument en faveur de
15 l'absence de contamination par des superantigènes bactériens ou du LPS.

Exemple 14 : Production d'anticorps monoclonaux.

La production d'anticorps monoclonaux par ascite impose une compatibilité du système H-2 entre l'hybridome et la souris productrice.
20 Des souris femelles Balb/c, âgées de 6 semaines, subissent une injection de 0.5ml de Pristane (2-6-10-14 acide tétraméthylpentadécane) dans leur cavité péritonéale, pour la production d'ascite (Porter et al., 1972). Une semaine à 10 jours plus tard, $5 \cdot 10^6$ à $10 \cdot 10^6$ hybridomes dilués dans environ 0.5ml de tampon stérile NaCl 0.145M, Na₂HPO₄ 10 mM, KCL 2.7
25 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM à pH 7.4. sont injectés par voie intrapéritonéale. L'ascite apparaît une à deux semaines plus tard. Les liquides d'ascites

présents dans la cavité péritonéale sont alors recueillis avec une seringue après incision du péritoine. Le liquide recueilli est centrifugé à 3000g pendant 15 minutes à température ambiante, filtré sur gaze pour éliminer le gras, puis tamponné en ajoutant 1/20^{ème} de son volume de tris-HCL 1M à pH 8.0. Cette méthode permet d'obtenir des quantités d'anticorps 10 fois supérieures à celles obtenues par culture d'hybridomes.

Les immunoglobulines présentes dans le liquide d'ascite sont relarguées par les sels (sulfate d'ammonium ou sulfate de sodium). Le liquide d'ascite est précipité par le sulfate d'ammonium 40%. Après 20 minutes au froid la solution est centrifugée 15 minutes 8000g à 4°C. Le précipité est lavé et resuspendu à froid dans une solution de sulfate d'ammonium 40% puis de nouveau centrifugé. Le nouveau précipité enrichi en IgG est remis en solution dans du tampon PBS et dialysé la nuit contre le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM pH 7.4. Parallèlement une colonne d'agarose-Protéine A (ou protéine G) (commercialisée sous forme lyophilisée, Pierce) est lavée extensivement avec le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 150mM pH7.4. La solution enrichie en IgG est déposée sur la colonne puis la colonne est lavée. Les IgG retenues par la colonne sont éluées à pH acide (glycine 200 mM pH 2.8). Les fractions éluées sont neutralisées avec un volume de Tris-Base 1M pH 10.5. Le contenu en immunoglobulines de chaque fraction recueillie est quantifiée par lecture d'absorbance à 280 nm ($e 1\%, 1\text{cm} = 14.0$ Prahl et Porter 1968). Les fractions riches sont poolées. Le degré de purification des IgGs poolées est analysé par électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS. Les IgGs purifiées sont dialysées une nuit contre le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 150mM pH7.4, filtrées stérilement, aliquotées et conservées à -20°C. Leur concentration finale est déterminée par lecture de l'absorbance à 280 nm ou par dosage micro-BCA.

Mais, il est à la portée de l'homme du métier de définir d'autres protocoles pour la production d'anticorps monoclonaux, par exemple à

partir des techniques décrites par Köhler et Milstein et par Galfre G. *et al.* précédemment cités ou des techniques dérivées de celles ci.

Exemple 15 : Mesure de l'activité des cellules T par prolifération cellulaire (Sredni et al., 1981).

Les cellules T sont lavées deux fois en milieu de culture pour éliminer toute trace d'IL2 présente dans le milieu initial de culture. Des lymphocytes B (EBV-LCL) ou des monocytes/macrophages pris comme cellules présentatrices de l'antigène, sont irradiées à 10000 rads, lavées deux fois avec du milieu de culture (RPMI). $2 \cdot 10^4$ cellules T ($2 \cdot 10^5$ cellules /ml) et $2 \cdot 10^4$ cellules B autologues irradiées ($2 \cdot 10^5$ cellules /ml) sont incubées ensemble en présence d'une gamme de concentration croissante de l'antigène sous un volume final de 200 μ l dans des micropuits. Après 48 heures de culture à 37°C, 1 μ Ci de 3H- thymidine dans 50 μ l de milieu RPMI est ajouté dans chaque puits. Les cellules T, seules à se diviser, incorporent la thymidine tritiée dans l'ADN. Après 18 heures de culture, les cellules de chaque micropuits sont récoltées sur des pastilles de laine de verre par aspiration. Après lyse osmotique des cellules, la radioactivité incorporée dans l'ADN est absorbée sur les pastilles (cell Harvester 530, Inotech). Chaque pastille séchée est placée dans un tube plastique qui contient 2 ml de scintillant ; la radioactivité adsorbée sur chacune des pastilles est quantifiée dans un compteur beta à scintillation liquide (LKB Rackbeta 1217). Les résultats sont exprimés comme moyenne arithmétique de cpm /culture ('coups par minute').

25

Exemple 16 : Protocole de détection de l'association entre peptides et molécules d'histocompatibilité (approche APC transformées par un peptide se fixant aux molécules du CMHI ou CMHII)

1) Matériel (exemple pour la molécule du CMHI):

Les sources de molécules d'histocompatibilité sont actuellement de deux types principaux : les cellules mutantes et les molécules d'histocompatibilité purifiées.

La cellule mutante utilisée est la cellule humaine T2 qui est un variant de la lignée T1 produite par fusion du lymphome T CEM et du lymphome B 721.174 (Salter and Cresswell *Embo J* 1986, 5: 943-949). Cette cellule qui est dépourvue de transporteurs de peptides contient des chaînes lourdes de molécules de classe I libres de peptides qui vont pouvoir accepter de peptides exogènes.

Des molécules d'histocompatibilité de classe I purifiées par chromatographie d'affinité à partir de lignées de cellules B humaines transformées par l'EBV peuvent être également utilisées. Dans ce cas les peptides endogènes doivent être éliminés par un traitement avec de l'urée 1.5 M et de la soude 12.5 mM (pH 11.7) pendant 1 heure à 4°C, suivi de leur élimination par une colonne de désalage (PDLO, Pharmacia). Les molécules d'histocompatibilité sont immédiatement remises en présence des peptides à tester dans un tampon PBS avec 0.05% Tween 20, 2 mM EDTA, 0.1% NP40 et 6 mM CHAPS, en présence de 2 µg/ml B2m pour faciliter la réassociation (Gnjatic et al., *Eur J Immunol* 1995 25 : 1638-1642). Les peptides testés ont en général 8 à 10 résidus, parfois 11 ou 12. Ils ont été synthétisés par Néosystems (Strasbourg), ou par Chiron mimotopes (Victoria, Australie). Ils sont utilisés à des concentrations variant de 100 µM à 0.1 nM.

2) Protocole de l'assemblage (Connan et al., *Eur J Immunol* 1994, 24 : 777 ; Couillin et al. *Eur J Immunol* 1995, 25 : 728-732).

Des aliquotes de 8.10^5 cellules dans un volume de 64 µl, répartis dans des tubes microfuge Eppendorf, sont mis en présence d'un tampon de lyse contenant 10 mM PBS, pH 7.5 1% NP40, des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF, 100 µM iodoacétamide, 2 µg /ml aprotinine, 10 µM leupeptine, 10 µM pepstatine et 10 µg/ml inhibiteur de trypsine). La

lyse se fait en présence des peptides à tester pendant 30 minutes ou 1 heure à 37°C. Après élimination du matériel non solubilisé par une centrifugation à 15 000 tours /minute à 4°C, le surnageant est additionné de 140 μ l de PBS contenant 0.05% de Tween 20, 3 mM d'azide de sodium, 1 mM PMSF et 10 mg /ml d'albumine bovine. Chaque échantillon est incubé pendant 20 heures à 4°C dans 2 puits d'une plaque à microtitration de type Nunc,Maxisorb, préalablement recouverts d'un anticorps monoclonal (10 μ g /ml en PBS) qui reconnaît les molécules d'histocompatibilité ayant une(des) conformation(s) conforme(s) pour la présentation de peptides et semblable(s) à celle(s) présente(s) à la surface des cellules. La plaque recouverte d'anticorps est préalablement saturée par de l'albumine bovine à 10 mg /ml dans du PBS-Tween avant la mise de l'échantillon. Le second anticorps permet la détection de l'assemblage des molécules d'histocompatibilité ciblées. Il est couplé soit à la biotine (NHS-LC biotin, Pierce) soit à la phosphatase alcaline (P-552, Sigma) et est incubé pendant une heure à 37°C. Dans le cas de l'emploi de la biotine, une incubation de 45 minutes à 20-25°C avec de la streptavidine couplée à la phosphatase alcaline (E-2636, Sigma) est réalisée. L'activité de la phosphatase alcaline est mesurée en utilisant comme substrat le 4-méthylumbelliféryl-phosphate (M-8883, Sigma) à 100 μ M dans de la diéthanolamine 50 mM, pH 9.5 avec du MgCl₂ 1 mM. La lecture est faite à 340/460 nm à l'aide d'un cytofluorimètre.

3) Stabilité des complexes HLA/peptides :

La stabilité des complexes précités a été étudiée car elle conditionne la bonne présentation de l'antigène et l'induction de la réponse T. A cet effet a été utilisé soit du HLA purifié, soit le lysat de la cellule. Avec le HLA purifié, les peptides endogènes ont été éliminés comme décrit en 2) puis mis en présence du peptide à tester en tube Eppendorf à 37°C, pendant des temps variables de quelques minutes à plusieurs jours. La phase suivante d'incubation sur plaque de 96 puits (comme décrit en 2)

avec l'anticorps anti-HLA se fait pendant une heure à 37°C. La révélation est effectuée de manière classique. Avec le lysat de la cellule, toutes les incubations sont également faites à 37°C, après ajout de tous les inhibiteurs de protéases.

Références bibliographiques sur les V β s.

Brenden N, et al., Differential MHC expression requirements for
5 positive selection of separate TCR V β families,. Immunogenetics. 1999
Jan;49(1):1-6.

Hodges E, et al., T cell receptor (TCR) V β gene usage in
bronchoalveolar lavage and peripheral blood T cells from asthmatic and
10 normal subjects,. Clin Exp Immunol. 1998 Jun;112(3):363-74.

Allen TM, et al., The T-cell receptor beta chain-encoding gene
repertoire of a New World primate species, the cotton-top tamarin,
Immunogenetics. 1996;45(2):151-60.

15 Yassai M, et al., Bacterial toxin superantigens stimulate all
members of susceptible V β gene families, Ann N Y Acad Sci. 1995 Jul
7;756:110-2.

20 Donahue JP, et al., Genetic analysis of low V β 3 expression
in humans,. J Exp Med. 1994 May 1;179(5):1701-6.

Isono T, et al., Sequence and diversity of variable gene
segments coding for rabbit T-cell receptor beta chains,. Immunogenetics.
25 1994;39(4):243-8.

Levinson G, et al., Sequence and diversity of rhesus monkey T-
cell receptor beta chain genes, Immunogenetics. 1992;35(2):75-88.

Buitkamp J, et al. , Vb6 T-cell receptor elements in artiodactyls: conservation and germline polymorphisms, Mamm Genome. 1993 Sep;4(9):504-10.

5 Johnston SL, et al., Diversity of alpha and beta subunits of T-cell receptors specific for the H4 minor histocompatibility antigen, Immunogenetics. 1997;46(1):17-28.

10 Huck S, et al., Variable region genes in the human T-cell rearranging gamma (TRG) locus: V-J junction and homology with the mouse genes, EMBO J. 1988 Mar;7(3):719-26.

Sherman LA, et al., Comparison of the H-2Kb-specific cytolytic T lymphocyte receptor repertoire in Igh recombinant strains, J Immunol.
15 1985 Jun;134(6):3569-73.

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection d'une activité superantigénique dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que l'on met en évidence une
5 expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et/ou V β 17 ou une perte majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et/ou V β 17.

2. Procédé de détection selon la revendication 1, caractérisé en
10 ce que l'on met en évidence une expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16.

3. Procédé de détection selon la revendication 1, caractérisé en
ce que l'on met en évidence une perte majoritaire de lymphocytes porteurs
15 d'un déterminant V β 16.

4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'on
met en évidence une expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un
déterminant V β 16 et une co-expansion de lymphocytes porteurs de V β s
20 choisis parmi au moins l'un quelconque des V β s 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22 et préférentiellement des V β s 3 et 12.

5. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'on
met en évidence une perte majoritaire de lymphocytes porteurs d'un
25 déterminant V β 16 et d'une co-diminution de lymphocytes porteurs de V β s choisis parmi au moins l'un quelconque des V β s 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, de préférence au moins l'un quelconque des V β s 7, 14 et 17 et avantageusement des V β s 7 et 17.

6. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'échantillon biologique provient d'un patient atteint d'une maladie auto-immune, en particulier la sclérose en plaques.

5 7. Procédé de détection d'une activité superantigénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que :

(i) on prélève un surnageant de culture de cellules mononucléées sanguines ou de cellules de plexus choroïdes ou de cellules leptoméningées, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une
10 maladie auto-immune ou suspectés d'avoir un risque de développer la maladie, en particulier la sclérose en plaques, ou d'une lignée cellulaire établie, telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 déposée à l'ECACC le 22 juillet 1992, sous le numéro 92072201 et LM7PC déposée à l'ECACC le 8 janvier 1993, sous le numéro 93010817, conformément
15 aux dispositions du Traité de Budapest, et

(ii) on met en contact ledit surnageant de culture ou une partie du surnageant de culture avec une série de cultures, de préférence au moins trois, de cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains, et

20 (iii) on détecte ladite expansion et éventuellement une co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution des cellules mononucléées sanguines de l'étape (ii).

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les
25 cellules mononucléées sanguines provenant de patients atteints de SEP sont choisies parmi les monocytes et les lymphocytes B et les cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains sont choisies parmi les lymphocytes T.

9. Procédé de détection d'une activité superantigénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que :

(i) on prélève des cellules mononucléées sanguines, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou de patients suspectés d'avoir un risque de développer une maladie auto-immune, en particulier la SEP, et d'individus sains,

(ii) on met en contact lesdites cellules mononucléées sanguines provenant des patients ou d'individus sains avec des surnageants de culture ou une fraction de surnageant de culture de cellules choisies parmi les cellules mononucléées sanguines, les cellules de plexus choroïdes et les cellules leptoméningées, les cellules issues de lignées cellulaires établies, telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 déposée à l'ECACC le 22 juillet 1992, sous le numéro 92072201 et LM7PC déposée à l'ECACC le 8 janvier 1993, sous le numéro 93010817, conformément aux dispositions du Traité de Budapest, et

(iii) on détecte ladite expansion et éventuellement co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution à partir des cellules mononucléées sanguines de l'étape (i).

10. Procédé selon les revendications 7, 8 et 9, caractérisé en ce que ladite expansion et éventuellement co-expansion est mise en évidence par utilisation de ligands, chaque ligand étant spécifique d'un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, de préférence des V β s 16, 3 et 12, et en ce que ladite perte et éventuellement co-diminution est mise en évidence par utilisation de ligands, chaque ligand étant spécifique d'un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, de préférence les V β s 16, 7, 14 et 17.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le ligand est un anticorps, de préférence un anticorps monoclonal ou un fragment d'anticorps.

5 12. Procédé selon la revendication 7, 8 et 9, caractérisé en ce que pour mettre en évidence ladite expansion et éventuellement co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution on réalise

(i) une extraction des ARN totaux des cellules mononucléées sanguines mises en présence de surnageant ou d'une fraction de
10 surnageant de culture SEP et en présence de surnageant ou d'une fraction de surnageant de culture témoin,

(ii) une transcription inverse desdits ARN,

(iii) une amplification spécifique de chaque famille de V β s à l'aide d'un couple d'amorces déterminé,

15 (iv) un marquage par tout marqueur approprié des produits d'amplification obtenus,

(v) une électrophorèse desdits produits d'amplification et analyse des profils d'électrophorèse obtenus, à l'aide d'un détecteur approprié.

20 13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que les cellules mononucléées sanguines provenant de patients atteints de SEP sont choisies parmi les lymphocytes.

25 14. Procédé de détection d'un état pathologique ou d'une prédisposition à un état pathologique dans un échantillon biologique caractérisé en ce que l'on met en évidence au moins l'un des paramètres suivants :

une activité superantigénique, telle que définie selon l'une
30 quelconque des revendications 1 à 13,

une stimulation de la production de cytokines, telles que l'IL-6 et INF- γ

une induction d'apoptose cellulaire.

5 15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'on détecte au moins deux des paramètres en association.

16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'on détecte une activité superantigénique et une induction d'apoptose ou
10 une activité superantigénique et une stimulation de la production de cytokines.

17. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'on détecte les trois paramètres en association.

15 18. Procédé selon la revendication 7, 8 et 9, caractérisé en ce que l'état pathologique est associé à une maladie auto-immune, telle que la sclérose en plaques.

20 19. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'activité superantigénique est induite directement ou indirectement par un agent effecteur choisi parmi les protéines et/ou les microorganismes et/ou les agents pathogènes.

25 20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que le micro-organisme est choisi parmi les bactéries et les rétrovirus, en particulier le rétrovirus est MSRV-1 et l'agent pathogène est MSRV-2.

30 21. Procédé de détection d'une activité superantigénique dans un échantillon biologique de patients atteints de sclérose en plaques,

caractérisé en ce que l'on met en évidence une expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 7 ou une perte majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 7.

5 22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que :

 (ii) on prélève un surnageant de culture de cellules mononucléées sanguines ou de cellules de plexus choroïdes ou de cellules leptoméningées, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou suspectés d'avoir un risque de développer la
10 maladie, en particulier la sclérose en plaques, ou d'une lignée cellulaire établie, telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 déposée à l'ECACC le 22 juillet 1992, sous le numéro 92072201 et LM7PC déposée à l'ECACC le 8 janvier 1993, sous le numéro 93010817, conformément aux dispositions du Traité de Budapest, et

15 (ii) on met en contact ledit surnageant de culture ou une partie du surnageant de culture avec une série de cultures, de préférence au moins trois, de cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains, et

 (iii) on détecte ladite expansion et éventuellement une co-
20 expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution des cellules mononucléées sanguines de l'étape (ii).

 23. Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que les
cellules mononucléées sanguines provenant de patients atteints de SEP
25 sont choisies parmi les lymphocytes B et les monocytes et les cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains sont choisies parmi les lymphocytes T.

 24. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que :

(i) on prélève des cellules mononucléées sanguines, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou de patients suspectés d'avoir un risque de développer une maladie auto-immune, en particulier la SEP, et d'individus sains,

5 (ii) on met en contact lesdites cellules mononucléées sanguines provenant des patients ou d'individus sains avec des surnageants de culture ou une fraction de surnageant de culture de cellules choisies parmi les cellules mononucléées sanguines, les cellules de plexus choroïdes et les cellules leptoméningées, les cellules issues de lignées cellulaires établies,
10 telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 déposée à l'ECACC le 22 juillet 1992, sous le numéro 92072201 et LM7PC déposée à l'ECACC le 8 janvier 1993, sous le numéro 93010817, conformément aux dispositions du Traité de Budapest, et

(iii) on détecte ladite expansion et éventuellement co-expansion
15 ou ladite perte et éventuellement co-diminution à partir des cellules mononucléées sanguines de l'étape (i).

25. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que l'on met en évidence l'activité superantigénique selon un protocole tel que
20 décrit dans les revendications 10 à 12 en utilisant un ligand ou une amplification associée à une électrophorèse.

26. Procédé d'évaluation de l'efficacité d'un agent ou d'une composition pour inhiber une activité superantigénique dans un échantillon
25 biologique, caractérisé en ce que

i) on prélève un surnageant de culture de cellules mononucléées sanguines ou de cellules de plexus choroïdes ou de cellules leptoméningées, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune, en particulier la SEP, ou de cellules d'une lignée
30 cellulaire établie, telles que les cellules des lignées PLI-2 et LM7PC,

(ii) on met en contact ledit surnageant ou une partie du surnageant de culture avec une série de cultures, de préférence au moins trois, de cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains en présence dudit agent ou de ladite composition à des doses prédéterminées, et

(iii) on détecte l'inhibition de ladite expansion et éventuellement co-expansion ou l'inhibition de ladite perte et éventuellement co-diminution des lymphocytes porteurs d'au moins un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, en particulier les V β s 16 et/ou 17, les V β s 16, 3 et 12 ou les V β s 16, 7, 14, et 17, en particulier les V β s 16, 7 et 17, par utilisation d'un ligand comme décrit dans les revendications 10 et 11 ou d'une amplification associée à une électrophorèse comme décrit dans la revendication 12.

27. Procédé d'évaluation de l'efficacité d'un agent ou d'une composition pour inhiber une activité superantigénique dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que

(i) on prélève des cellules mononucléées sanguines, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou suspectés d'avoir un risque de développer la maladie, en particulier la SEP et d'individus sains,

(ii) on met en contact lesdites cellules mononucléées sanguines provenant de patients ou d'individus sains avec des surnageants de culture ou une fraction de surnageant de culture de cellules choisies parmi les mononucléées sanguines, les cellules de plexus choroïdes, les cellules leptoméningées, les cellules issues de lignées cellulaires établies, telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 et LM7PC, et

(iii) on détecte l'inhibition de ladite expansion et éventuellement co-expansion ou l'inhibition de ladite perte et éventuellement co-diminution à partir des cellules mononucléées sanguines de l'étape (i), en présence

dudit agent ou de ladite composition à des doses déterminées, des lymphocytes porteurs d'au moins un déterminant choisi parmi les Vβs 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, en particulier les Vβs 16 et/ou 17, les Vβs 16, 3 et 12 ou les Vβs 16, 7, 14, et 17, en particulier les Vβs 16, 7 et 17, par utilisation d'un ligand comme décrit dans les revendications 10 et 11 ou d'une amplification associée à une électrophorèse comme décrit dans la revendication 12.

28. Procédé selon l'une des revendications de 26 et 27, caractérisé en ce que les cellules proviennent d'un patient atteint d'une maladie auto-immune, en particulier de sclérose en plaques.

29. Procédé selon les revendications 26 à 28, caractérisé en ce que les cellules mononucléées sanguines provenant de patients atteints de SEP sont choisies parmi les lymphocytes B et les monocytes.

30. Procédé d'évaluation de l'efficacité prophylactique et/ou thérapeutique d'un agent ou d'une composition vis-à-vis d'un état pathologique, et/ou d'une prédisposition à un état pathologique, caractérisé en ce que l'on met en évidence une inhibition d'une activité superantigénique dans un échantillon biologique comme décrit dans les revendications 26 à 29.

31. Procédé selon la revendication 30, caractérisé en ce que l'on met en évidence l'inhibition de la perte majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant Vβ16 et de la co-diminution de lymphocytes porteurs de Vβs7 et 17.

32. Procédé selon la revendication 30, caractérisé en ce que l'on met en évidence l'inhibition de l'expansion majoritaire de lymphocytes

porteurs d'un déterminant V β 16 et de la co-expansion de lymphocytes porteurs de V β s 3 et 12.

33. Procédé selon l'une des revendications de 31 et 32,
5 caractérisé en ce que les cellules proviennent d'un patient atteint d'une maladie auto-immune, telle que la sclérose en plaques.

34. Procédé selon les revendications 30 à 33, caractérisé en ce
que les cellules mononucléées sanguines provenant de patients atteints de
10 SEP sont choisies parmi les lymphocytes B et les monocytes.

35. Procédé d'évaluation de l'efficacité prophylactique et/ou
thérapeutique d'un agent ou d'une composition vis-à-vis d'un état
pathologique, et/ou d'une prédisposition à un état pathologique, caractérisé
15 en ce que l'on met en évidence une inhibition d'une activité
superantigénique dans un échantillon biologique comme décrit dans les
revendications 30 à 34.

36. Composition à usage thérapeutique et/ou prophylactique,
20 caractérisée en ce qu'elle comprend, entre autres, un agent thérapeutique
capable d'inhiber une activité superantigénique dans un échantillon
biologique, telle que définie dans les revendications 26 à 35,
éventuellement en association avec un excipient et/ou un adjuvant et/ou un
diluant pharmaceutiquement acceptables.

25

37. Composition selon la revendication 36, caractérisée en ce
que l'agent thérapeutique est choisi parmi une molécule naturelle et/ou une
molécule recombinante, ou un fragment desdites molécules, dont la
séquence protéique correspond à la séquence des molécules V β s16 et/ou
30 17, de préférence V β 16, éventuellement en association avec une ou des

molécules naturelles et/ou recombinantes ou un fragment desdites molécules dont la séquence protéique correspond à la séquence des molécules V β s 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22 et préférentiellement des molécules V β s 3 et 12.

5

38. Composition selon la revendication 36, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique est choisi parmi une molécule naturelle et/ou une molécule recombinante, ou un fragment desdites molécules, dont la séquence protéique correspond à la séquence de la molécule V β 16 et/ou 10 17, éventuellement en association avec une ou des molécules naturelles et/ou recombinantes ou un fragment desdites molécules dont la séquence protéique correspond à la séquences des molécules V β s 7, 14 et 17 et préférentiellement des molécules V β s 7 et 17.

15

39. Composition selon la revendication 36, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique est choisi parmi les molécules naturelles, et/ou recombinantes et/ou de synthèse ou un fragment desdites molécules qui codent pour les molécules telles que définies dans les revendications 37 et 38.

20

40. Composition selon la revendication 39, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique et/ou prophylactique est choisi parmi les gènes thérapeutiques comprenant des molécules ADN et/ou ARN.

25

41. Composition prophylactique et/ou thérapeutique selon la revendication 36, caractérisée en ce que l'agent prophylactique et/ou thérapeutique est choisi parmi les oligonucléotides anti-sens et les oligonucléotides anti-gènes.

42. Composition prophylactique et/ou thérapeutique selon la revendication 36, caractérisée en ce que l'agent prophylactique et/ou thérapeutique est choisi parmi au moins un ligand susceptible d'interagir avec les V β s 16 et/ou 17, en particulier le V β 16, éventuellement en association avec au moins un ligand susceptible d'interagir avec au moins un des V β s 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22 et préférentiellement les V β s 3 et 12.

43. Composition selon la revendication 42, caractérisée en ce que le ligand est choisi parmi les anticorps, de préférence les anticorps monoclonaux et les anti-récepteurs des TCRs des différents V β s.

44. Composition prophylactique et/ou thérapeutique selon la revendication 36, caractérisée en ce que l'agent prophylactique et/ou thérapeutique est choisi parmi au moins un ligand susceptible d'interagir avec le V β 16 et/ou 17, éventuellement en association avec au moins un ligand susceptible d'interagir avec au moins un des V β s 7, 14 et 17 et 22 et préférentiellement les V β s 7 et 17.

45. Composition selon la revendication 44, caractérisée en ce que le ligand est choisi parmi les anticorps, de préférence les anticorps monoclonaux et les anti-récepteurs des TCRs des différents V β s.

46. Composition thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique et/ou prophylactique est un agent susceptible de bloquer l'interaction du superantigène aux cellules présentatrices d'antigène.

47. Composition thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique et/ou prophylactique est choisi

parmi au moins une cellule modifiée génétiquement *in vitro*, de préférence une cellule d'origine mammifère, par un agent thérapeutique qui consiste en au moins une molécule d'acide nucléique codant pour au moins une molécule dont la séquence protéique correspond à la séquence codant pour
5 les molécules telles que définies dans les revendications 36 et 40, en particulier une molécule ADN et/ou ARN.

48. Composition selon la revendication 36, caractérisée en ce l'agent thérapeutique et/ou prophylactique est choisi parmi au moins une
10 cellule modifiée génétiquement *in vitro*, de préférence une cellule d'origine mammifère, par un agent thérapeutique qui consiste en au moins une molécule d'acide nucléique codant pour au moins un ligand tel que défini dans les revendications 44 et 45, en particulier une molécule ADN et/ou ARN.

15

49. Utilisation d'une composition telle que définie dans les revendications 36 à 48, pour la prophylaxie et/ou le traitement d'une pathologie, en particulier une maladie auto-immune, telle que la sclérose en plaques.

20

FIG 1

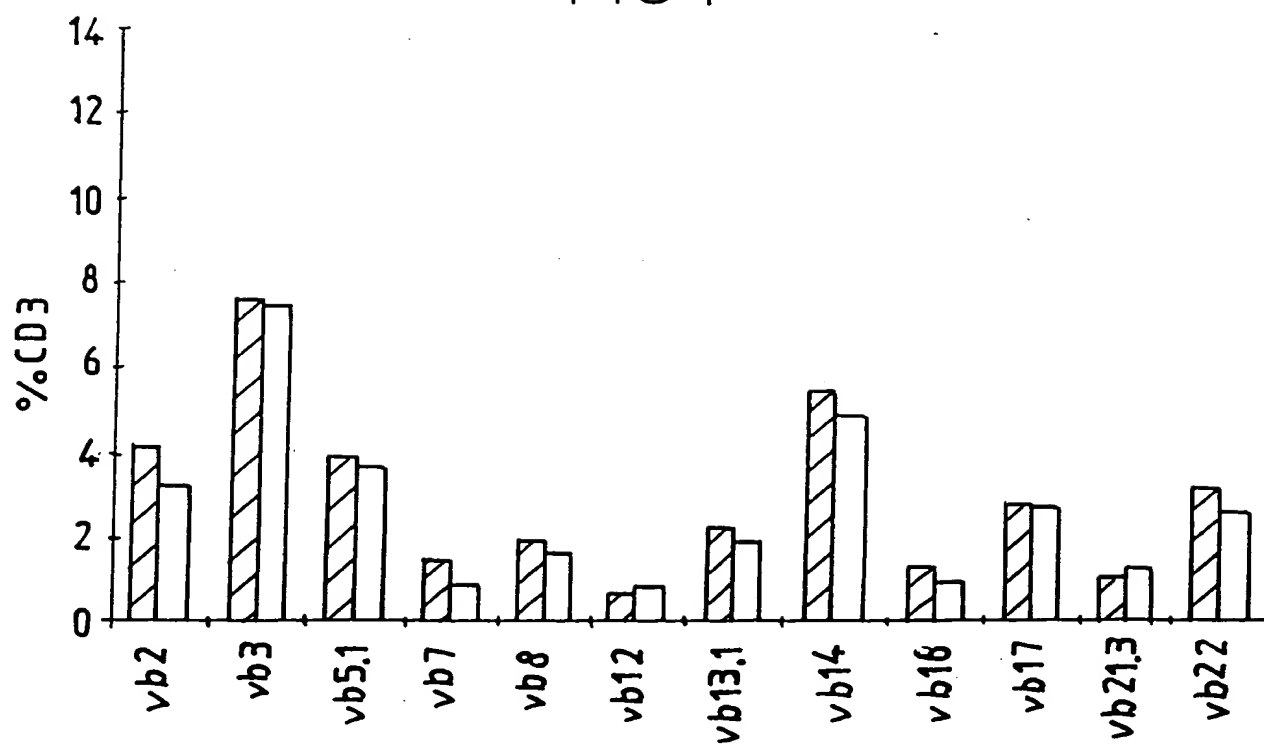


FIG 2

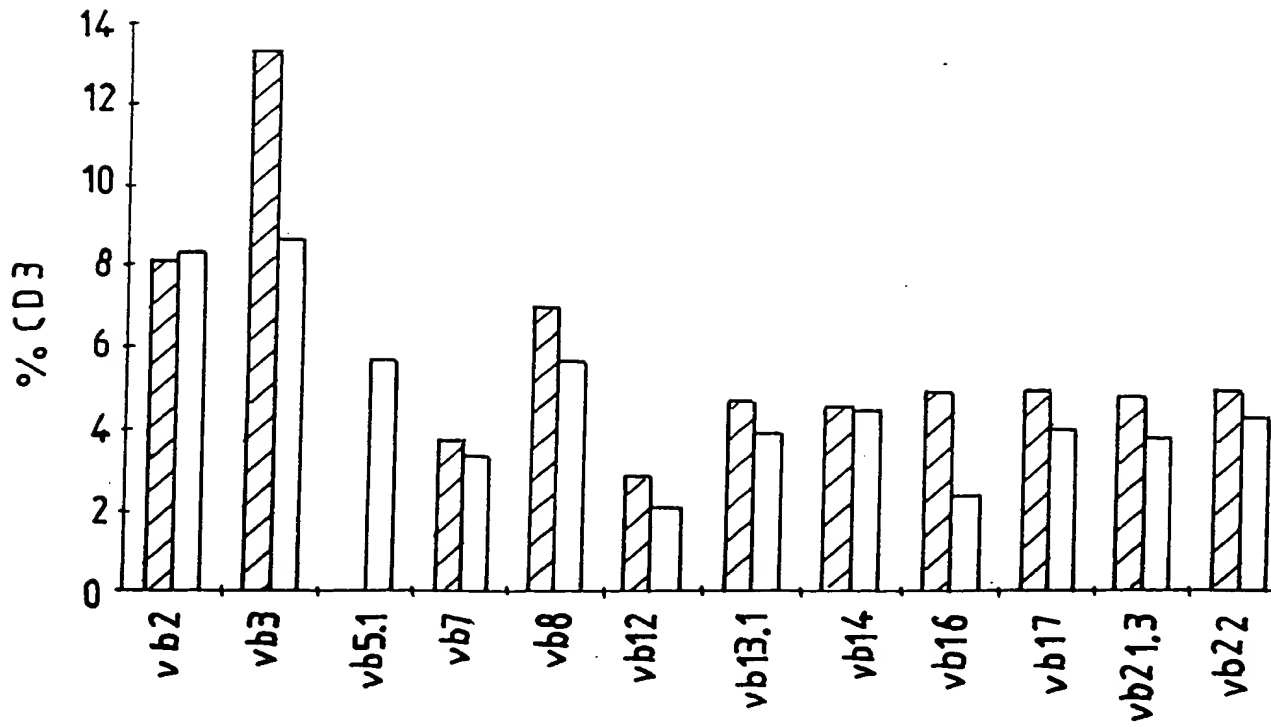
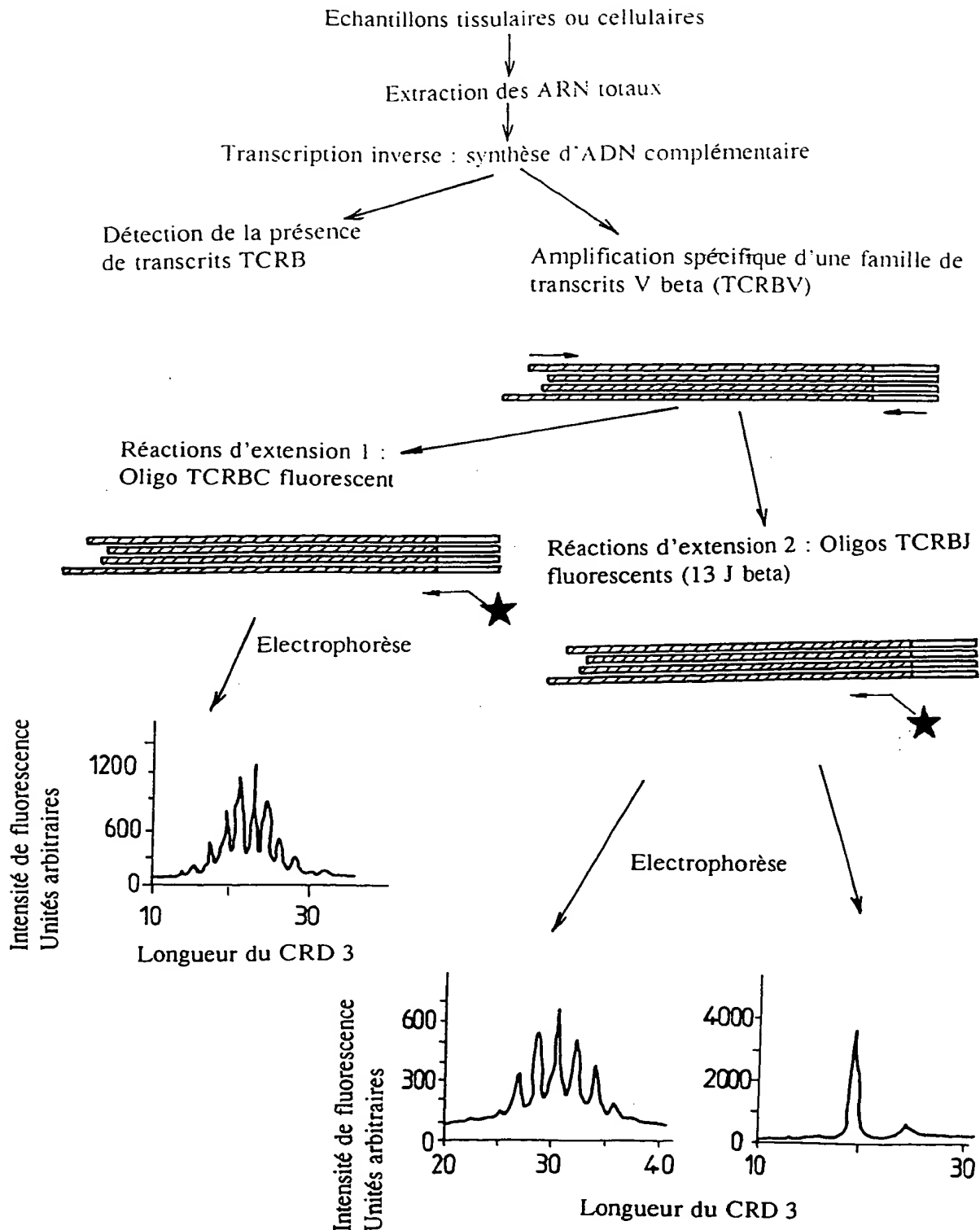


FIG 3

Méthode générale



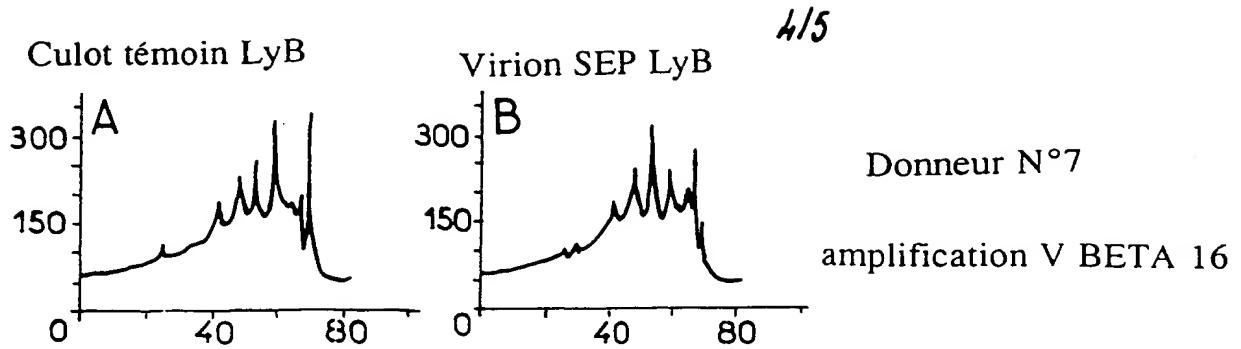
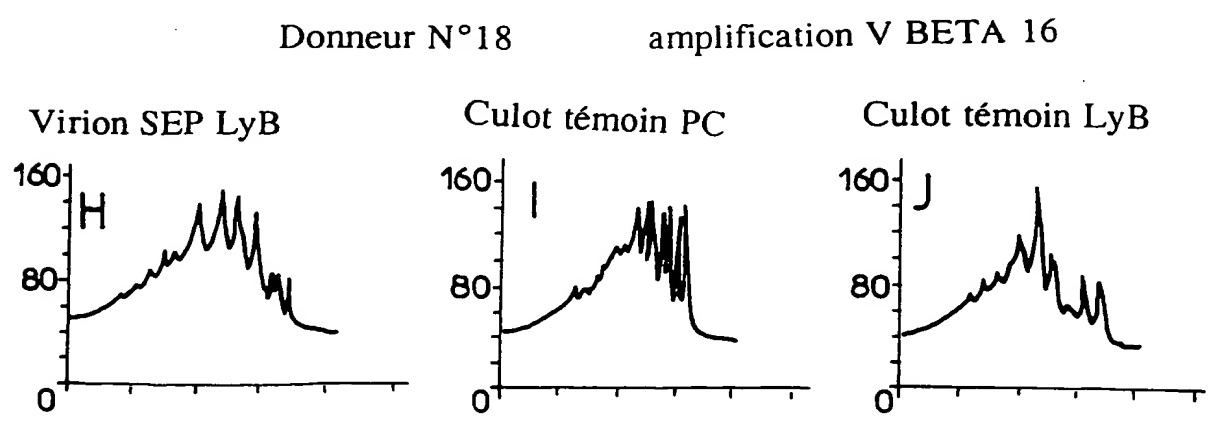
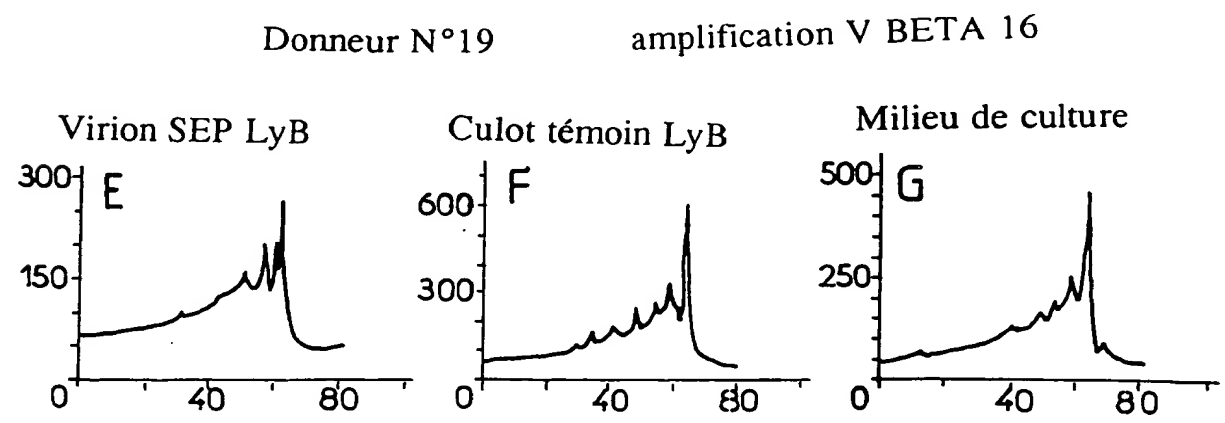
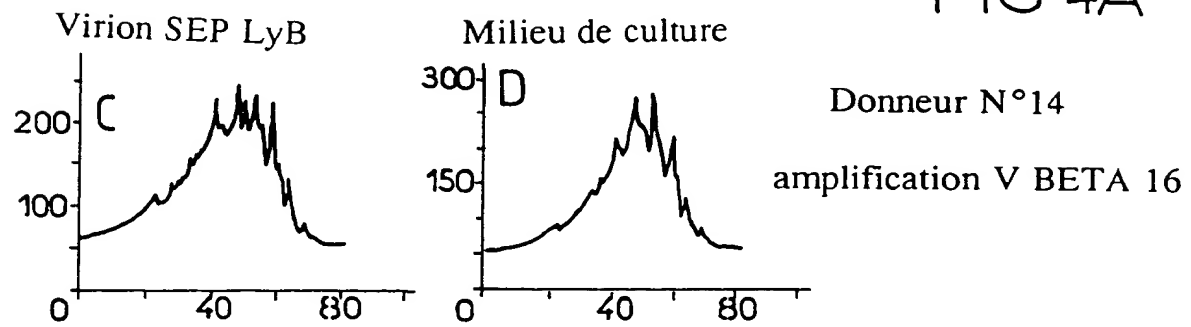


FIG 4A



Donneur N° 19 amplification V BETA 17

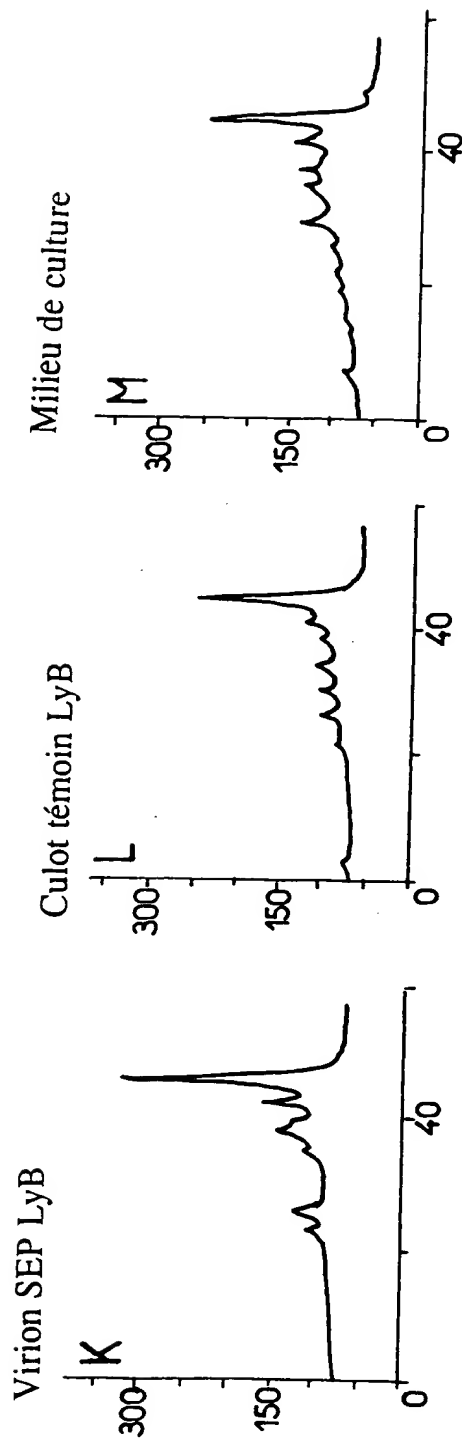


FIG 4B